

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON  
ELECTROEYACULADOR (EE) DE TOROS TRATADOS CON Y SIN  
TRANQUILIZANTE”**

Tesis previa a la obtención del Título  
de Médica Veterinaria Zootecnista.

**AUTORAS:**

Diana Maricela Brito Tene 0107185217

Nancy Yolanda Reinoso Chacón 1401184146

**DIRECTOR ENCARGADO:**

Dr. Jhonny Alfredo Narváez Terán. Mg. Sc. 0102291218

CUENCA-ECUADOR

2017



## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue mejorar las condiciones de colecta seminal con Electroeyaculador (EE) intentando sobre todo preservar el bienestar animal durante el proceso de la colecta. Se realizó con tres toros adultos de fenotipo Criollo, en dos situaciones diferentes: T1- sin tranquilizante y T2- con tranquilizante (xilacina 2%) aplicado previo a la colecta. El semen fue colectado durante 9 sesiones, sumando un total de 27 colectas. Para determinar el efecto del tranquilizante durante la extracción seminal se evaluaron dos indicadores de estrés; cortisol y progesterona, mediante muestras sanguíneas tomadas en cinco momentos: 20 y 5 minutos antes, al momento de la colecta y a los 5 y 20 minutos posteriores a ésta, y también por medio de muestras fecales. Además, se analizó las características seminales cuali-cuantitativas; luego se procesó, congeló y valoró posdescongelación con el fin de evaluar el efecto del tranquilizante. El análisis seminal en fresco no fue significativo ( $P > 0,05$ ) al comparar los dos tratamientos, pero en posdescongelación si existió diferencias ( $P < 0,05$ ) para la variable HOST. Los niveles séricos de cortisol mostraron diferencias significativas a los 5 minutos antes y 5 minutos posteriores a la colecta, para P4 hubo diferencias a los 5 minutos luego de la colecta. Estas dos hormonas al ser analizarlas en heces a las 8 horas luego de la electroeyaculación, fueron estadísticamente diferentes al comparar los tratamientos. En conclusión, el uso de xilacina no mejora las características seminales, sin embargo disminuye el estrés generado tras el proceso de electroeyaculación en toros.

**Palabras Claves:** Electroeyaculación, semen, tranquilizante, criopreservación, toros, bienestar animal.



## ABSTRACT

The objective of this research was to improve the conditions of seminal collection with Electroeyaculador (EE), trying above all to preserve animal welfare during the collection process. It was performed with three adult bulls of Criollo phenotype, in two different situations: T1- without tranquilizer and T2- with tranquilizer (xylazine 2%) applied prior to collection. The semen was collected during 9 sessions, adding a total of 27 collections. To determine the effect of the tranquilizer during the seminal extraction, two stress indicators were evaluated; Cortisol and progesterone by means of blood samples taken at five moments: 20 and 5 minutes before, at the time of collection and 5 and 20 minutes after the collection, and also by means of fecal samples. In addition, qualitative and quantitative seminal characteristics were analyzed; Then processed, frozen and evaluated post-thawing in order to evaluate the effect of the tranquilizer. Fresh seminal analysis was not significant ( $P > 0.05$ ) when comparing treatments, but in post-thawing if there were differences ( $P < 0.05$ ) for the HOST variable. Serum levels of cortisol showed significant differences at 5 minutes before and 5 minutes after collection, for P4 there were differences at 5 minutes after collection. These two hormones, when analyzed in feces at 8 hours after electroejaculation, were statistically different when comparing treatments. In conclusion, the use of xylazine does not improve the semen characteristics, however it decreases the stress generated after the process of electroejaculation in bulls.

**Keywords:** Electroejaculation, semen, tranquilizer, cryopreservation, bulls, animal welfare.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	15
1.1. Objetivo general .....	17
1.2. Objetivos Específicos .....	17
1.3. Hipótesis .....	17
2. CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA .....	18
2.1. Métodos para colectar semen .....	18
2.1.1. Uso de la Vagina Artificial (VA) .....	18
2.1.2. Electroeyaculación .....	19
2.1.3. Masaje transrectal (MTR) .....	20
2.2. Fisiología de la reproducción del macho .....	21
2.3. Neuroendocrinología .....	23
2.4. Estrés .....	23
2.4.1. Muestras para medir el estres .....	24
2.4.2. Biomarcadores para medir el estrés .....	25
2.5. Cortisol .....	25
2.5.1. Metabolismo del Cortisol .....	26
2.6. Progesterona .....	26
2.6.1. Metabolismo y excreción .....	26
2.7. Inmunoanálisis de Cortisol y Progesterona .....	27
2.8. Tranquilización en bovinos .....	27
2.8.1. Usos .....	27
2.8.2. Los tranquilizantes se dividen en: .....	27
2.8.3. Clorhidrato de Xilacina .....	28
2.9. Valoración seminal .....	29
2.9.1. Características Macroscópicas .....	29



2.9.2.	Características Microscópicas .....	29
2.10.	Procesamiento del semen.....	31
2.10.1.	Dilución.....	31
2.10.2.	Envasado y Sellado de las pajuelas.....	32
2.10.3.	Fase inicial de enfriamiento.....	32
2.10.4.	Equilibración (estabilización) .....	33
2.10.5.	Congelación .....	33
2.10.6.	Almacenamiento.....	33
2.11.	Descongelación .....	33
2.11.1.	Valoración Seminal Posdescongelación.....	34
2.12.	Extracción de sangre .....	34
2.12.1.	Sujeción y equipamiento .....	35
2.12.2.	Toma de la muestra.....	35
2.12.3.	Canulación .....	35
2.13.	Heparina .....	36
3.	CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1.	Materiales.....	37
3.1.1.	Biológicos .....	37
3.1.2.	Físicos .....	37
3.1.3.	Químicos .....	37
3.2.	Método .....	38
3.2.1.	El área de estudio.....	38
3.2.2.	Unidad de análisis .....	38
3.2.3.	Metodología.....	39
3.2.4.	Diseño experimental y análisis estadístico .....	45
4.	CAPITULO IV: RESULTADOS.....	47
5.	CAPITULO V: DISCUSIÓN .....	52



5.1.	Características seminales en fresco.....	52
5.2.	Características seminales posdescongelación.....	52
5.3.	Niveles plasmáticos de cortisol .....	53
5.4.	Niveles plasmáticos de P4 .....	54
5.5.	Cortisol en heces .....	55
5.6.	P4 en heces .....	56
6.	CAPITULO VI: CONCLUSIONES .....	57
7.	RECOMENDACIONES .....	58
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	59
9.	ANEXOS .....	70



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anormalidades de los espermatozoides.....	31
<b>Figura 2.</b> Ubicación de la Granja de Irquis de la U. de Cuenca.....	38



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Evaluación del color seminal con sus categorías en los tratamientos en estudio.....	47
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de calidad espermática en semen fresco en ambos tratamientos.....	48
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de calidad espermática posdescongelación por tratamiento. ....	49
<b>Tabla 4.</b> Evaluación del Cortisol sérico de los animales en estudio.....	50
<b>Tabla 5.</b> Resultados del Análisis de P4 sanguínea de los toros en estudio.	50
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la evaluación de metabolitos de Cortisol en heces.	51
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la evaluación de Progesterona (ng/g) en heces. ....	51





## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

- AC:** Anormalidades de Cola  
**AT:** Anormalidades Totales  
**CE:** Concentración Espermática  
**EE:** Electroeyaculador / Electroeyaculación  
**IM:** Intramuscular  
**MIP:** Motilidad Individual Progresiva  
**MM:** Motilidad Masal  
**MTR:** Masaje Transrectal  
**PM:** Permeabilidad de la Membrana  
**P.V:** Peso vivo  
**P<sub>4</sub>:** Progesterona  
**Rpm:** Revoluciones por minuto  
**VE:** Vitalidad Espermática



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

---

### CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Diana Maricela Brito Tene, autora del Trabajo de Titulación **"EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULADOR (EE) DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE"**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 22 de marzo del 2017.



Diana Maricela Brito Tene

C.I: 0107185217



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

### CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Nancy Yolanda Reinoso Chacón, autora del Trabajo de Titulación **“EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULADOR (EE) DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 22 de marzo del 2017.



Nancy Yolanda Reinoso Chacón

C.I: 1401184146



### CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Diana maricela Brito Tene, autora de la tesis **“EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULADOR (EE) DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE”** certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 22 de marzo del 2017.

Diana Maricela Brito Tene

C.I: 0107185217



Universidad de Cuenca  
Cláusula de propiedad intelectual

---

### CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Nancy Yolanda Reinoso Chacón, autora de la tesis **"EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULADOR (EE) DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE"** certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 22 de marzo del 2017.

Nancy Yolanda Reinoso Chacón

C.I: 1401184146



## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, le damos gracias a DIOS por brindarnos la vida y la perseverancia para poder culminar nuestros estudios universitarios, a pesar de los obstáculos que se nos presentaron, ya que sin él sería imposible lograrlo.

A nuestros padres, familiares y amigos por estar pendientes y apoyarnos incondicionalmente a lo largo de nuestras vidas y sobre todo para alcanzar este objetivo.

También agradecemos infinitamente a nuestros maestros y amigos: a nuestro director Dr. Jhonny Narváez, al Dr. Ulises Iñiguez, Dr. Ricardo Alberio, Dr. Andrés Galarza, Dr. Daniel Argudo, Ing. Patricio Bueno, quienes nos apoyaron y estuvieron presentes en cada una de las etapas de nuestro proyecto hasta su culminación.

Al laboratorio de Biotecnología de la reproducción de la Facultad de Ciencias agropecuarias de la Universidad de Cuenca por la colaboración para la ejecución del trabajo de tesis.

Al Dr. Rupert Palme por su gran colaboración en la evaluación de los metabolitos de cortisol y progesterona de las muestras de heces que fueron enviadas al Departament of Biomedical Science/ Biochemistry University of Veterinary Medicine Vienna, Austria.



## DEDICATORIA

### A mis padres:

**Rosario:** Por darme la vida y por todas las enseñanzas a lo largo de mi vida, te amo mami, gracias.

**Julio:** Por el apoyo y cariño brindado para conmigo. Gracias papá.

### A mi familia:

A mis hermanos y hermanas por su apoyo y motivación en la finalización de mi carrera. De manera especial a mi hermano Patricio y a mis hermanas Norma y Verónica por su amor, motivación y apoyo fundamental para que todo esto sea posible las amo.

**Los amo,  
Diana.**

### A MI FAMILIA

A mi esposo Adrián y a nuestra bebé Daniela, que son el motor de mi vida, quienes con su apoyo y amor me impulsan a seguir siempre adelante y lograr ser una mejor persona y profesional.

A mi madre Dolores, mi amiga incondicional, quien me ha inculcado los mejores valores y me ha dado el ejemplo a seguir luchando con amor y paciencia día tras día, gracias por todo mamita.

A mis abuelos (Teresa y Miguel), tías (Elsa e Irma), tíos (José y Luis), quienes con cariño me han apoyado y orientado a lo largo de mi vida.

**Los amo,  
Nancy**

## 1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La base de la inseminación artificial consiste en la obtención de semen del reproductor de interés, para luego procesar el eyaculado y multiplicar la descendencia de aquellos animales de alto valor genético, afectivo, etc. Las técnicas actuales para la colecta de semen son el uso de la vagina artificial (AV), el electroeyaculador (EE) y el masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias (MTR). El uso de la AV es el método menos estresante y más fisiológico para la colecta de semen (Sylla *et al.*, 2015); sin embargo, este método se considera algo dificultoso porque requiere de instalaciones apropiadas, de animales dóciles y previamente entrenados (Arieta *et al.*, 2014). Alternativamente al uso de la VA, se utiliza el método de la electroeyaculación, con el que podemos minimizar las desventajas mencionadas anteriormente y a su vez permite obtener eyaculados con mayor volumen y menor concentración que los obtenidos con VA (Gómez, 2013; Rego *et al.*, 2015).

Existen numerosos informes que describen la eficacia de la electroeyaculación como un método de colecta de semen en toros pero, en los últimos años, existen limitaciones para el uso de esta técnica debido al estrés y el posible dolor que causa, existiendo preocupación con respecto al bienestar animal (Khair *et al.*, 2011; Barth *et al.*, 2004). Por ello, la colecta de semen con electroeyaculador en Gran Bretaña no es recomendada si los animales no están anestesiados y en otros países como Suecia ha sido prohibida en animales conscientes (Palmer, 2005).

La colecta de semen por MTR ha sido descrita en el ganado durante muchos años. Con el uso de este método, es posible obtener eyaculados de toros sin entrenamiento y sin utilizar ningún equipo costoso (Sylla *et al.*, 2015). El MTR de las glándulas sexuales accesorias es una alternativa a la estimulación eléctrica (Santiago *et al.*, 2013). Palmer *et al.*, (2004) demostraron que el MTR, dirigido específicamente hacia la región ampular del conducto deferente, fue eficaz para producir la emisión de semen, sin embargo, esta técnica que es de gran valor para obtención y evaluación del semen de reproductores, no lo es tanto para la colecta de semen destinado





a su preservación para programas de mejora genética. Esto se debe a los menores volúmenes que se obtienen con la misma, lo cual disminuye la cantidad de dosis obtenidas por eyaculado.

Tomando en cuenta las ventajas y desventajas de los distintos métodos, la electroeyaculación asociada al masaje de vesículas seminales es la técnica más adecuada para la colecta de semen. Sin embargo, como se mencionó antes, existen limitaciones para su uso ya que altera el bienestar animal.

Estudios realizados por Palmer *et al.*, (2004) demuestran que es posible reducir ligeramente el dolor generado con la electroeyaculación al asociarla con el MTR, pero no se ha visto que esto reduzca el estrés evaluado por medio del cortisol evaluado en sangre o en heces.

Hasta el momento existe escasa información con respecto al efecto de un tranquilizante como moderador del estrés durante el proceso de la electroeyaculación, a pesar que se conoce su efecto, ya que disminuye el cortisol en ratas sometidas a estrés calórico (Fayed *et al.*, 1994). Esta propuesta se ve reforzada por el estudio realizado por Withlock *et al.*, (2012) en la que determinó que el efecto más importante de la electroeyaculación con respecto al bienestar animal, estaría dado por el estrés más que por el dolor.

Existen numerosos antecedentes que permiten utilizar la concentración de cortisol en sangre como indicador indirecto del estrés (Falk *et al.* 2001). Asimismo, ha sido determinado que en animales de laboratorio y en bovinos (Barbaccia *et al.* 2001), los niveles de progesterona de origen adrenal también se modifican ante la presencia de estrés. Por estas razones se usarán estos dos indicadores (niveles de cortisol y progesterona) como posibles predictores del estrés asociado al uso de la electroeyaculación, como ya fueron utilizados en un estudio similar realizado por Whitlock *et al.*, (2012).

En base a estos antecedentes, se plantearon los siguientes objetivos:



### **1.1. Objetivo general**

Mejorar las condiciones de colecta de semen de toro con el EE, intentado sobre todo preservar el bienestar animal durante el proceso de la colecta.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar las características cualitativas y cuantitativas del semen de bovino obtenido por medio de electroeyaculación, con y sin tranquilizante previo a la colecta
- Determinar los niveles plasmáticos de cortisol y progesterona de los toros en estudio.

### **1.3. Hipótesis**

El uso de tranquilizantes previo a la colecta seminal de toros con EE mejora la calidad y cantidad del semen obtenido al disminuir el estrés provocado por la técnica.

## 2. CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Métodos para colectar semen

- El uso de Vagina artificial
- Electroeyaculación
- Masaje Trans Rectal de las ampollas deferentes (Galina & Valencia, 2009).

#### 2.1.1. Uso de la Vagina Artificial (VA)

El método de colecta de semen con el uso de la VA es comúnmente utilizada en centros de cría artificial. Este método es muy eficiente para la colecta seminal de toros, debido a que los eyaculados obtenidos son de excelente calidad al momento de la evaluación (Morillo *et al.*, 2012; Galina & Valencia, 2009).

La aplicación de este método requiere la utilización de un animal para la monta (hembra en celo) o un maniquí y la vagina artificial; este método simula la monta natural (Gómez, 2013). El equipamiento de la vagina artificial constituye un tubo rígido de hule, con una válvula exterior, por el lumen del tubo se introduce una manga de látex y se dobla sobre los extremos formando una cámara de aire (Galina & Valencia, 2009), que se llena con agua temperada a 45 - 46 °C, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación. En uno de los extremos de la VA se coloca un embudo de látex que sostiene un tubo graduado, que recibe el eyaculado (Morillo *et al.*, 2012).

#### Ventajas

- Los eyaculados obtenidos son de baja contaminación.
- El equipo que se requiere es de bajo costo (Arieta *et al.*, 2014).
- Permite la observación del comportamiento de monta y la eyaculación de toros (Barth *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2011).

## Desventajas

- Se requiere de animales dóciles y entrenados (Arieta *et al.*, 2014); (Gómez, 2013).
- No es adecuado para los toros que no están acostumbrados a la manipulación humana (Palmer *et al.*, 2005).

### 2.1.2. Electroeyaculación

El método de electroeyaculación es una técnica que permite obtener semen de toros sanos que no aceptan la utilización de VA como método de colección, debido a que para esto es necesario un entrenamiento previo, y de aquellos en que es imposible la ejecución de la monta. Por ejemplo: animales que padecen de poliartritis, fracturas, anquilosis, etc (Galina & Valencia, 2009).

Para este método de colecta seminal se utiliza un electroeyaculador, que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por estímulos eléctricos con una carga no mayor a 20 voltios y entre 0 y 1000 miliamperios (López, 2014).

Al momento del manejo del electroeyaculador se debe colocar el electrodo sobre la ampolla de Henle y las glándulas vesiculares. Es importante que el electrodo se ajuste contra el ano y moverlo hacia adelante y atrás, de esta manera se aplica el estímulo eléctrico sobre los centros nerviosos que producen la erección y la eyaculación (Barrios, 2005).

Al inicio la intensidad de los estímulos aplicados debe ser mínima y se deben ir aumentando paulatinamente hasta que se produzca la eyaculación (Galina & Valencia, 2009). Cada estímulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre 5 y 10 estímulos por cada grado de intensidad (Morillo *et al.*, 2012).

Previo a la utilización del electroeyaculador se debe preparar al animal; corte del vello prepucial, limpieza de la zona peneana, del recto y estimulación mediante masaje transrectal y, posteriormente, introducción de la sonda rectal (Arieta *et al.*, 2014).

Es muy importante considerar el intervalo de colecta seminal debido a que, una baja frecuencia puede afectar la motilidad y vitalidad espermática, en cambio, una alta frecuencia puede afectar la concentración y madurez. Estudios en la raza Holstein sugieren una frecuencia de colecta de dos veces por semana (Morillo *et al.*, 2012).

### **Ventajas**

- No es necesaria la voluntad del animal en el momento de la colecta seminal.
- No se necesita una vaca en celo
- Es muy útil en toros que padecen de enfermedades que les impide la monta (Roses, 2013).

### **Desventajas**

- Se considera que es doloroso. Este método aplicado sin anestesia ha sido desaprobado en el Reino Unido y prohibido en varios países europeos (Palmer *et al.*, 2005).
- Es necesario que el operador tenga experiencia para colectar el semen, ya que es posible que se genere dolor e incomodidad del animal al momento de la estimulación eléctrica.
- El equipo necesario es costoso (Rosés, 2013).

#### **2.1.3. Masaje transrectal (MTR)**

Para la ejecución de ésta técnica se requiere de la participación de dos personas, una para efectuar el masaje rectal y otra para colectar el semen. Es necesario ubicar al toro en una manga, después de remover las heces del recto (Galina & Valencia, 2009), se aplica un movimiento vigoroso de ida y vuelta de la mano sobre el área de la pelvis, uretra, próstata y ampollas (Palmer *et al.*, 2005). Al iniciarse la pulsación del músculo uretral, el masaje debe continuar en sincronía con las pulsaciones y la otra persona debe recoger el semen en una probeta de vidrio (Angelino, 2009).

## Ventajas

- No requiere un equipo costoso
- Evita el dolor que puede ocasionar otras técnicas (Angelino, 2009).

## Desventajas

- Irritación de la mucosa rectal
- Falta de protrusión del pene que resulta en muestras contaminadas.
- Se necesita de una segunda persona para colectar la muestra.
- Dificulta la estimulación de machos excitados o de mal carácter
- Se requiere de un operador con mucha destreza (Arieta *et al.*, 2014).

## 2.2. Fisiología de la reproducción del macho

El aparato reproductor del macho generalmente cumple dos funciones:

- La producción de espermatozoides
- La elaboración de hormonas sexuales masculinas

El aparato reproductor del macho según (Gómez, 2013) está compuesto de:

- **Órganos Internos:** testículos, conductos excretores (epidídimo, conductos deferentes y uretra) y glándulas accesorias (Vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales).
- **Órganos externos:** pene.

## Testículos

Los testículos son los encargados de realizar dos funciones, la de segregar y producir hormonas sexuales masculinas y espermatozoides siendo la testosterona la más importante debido a que esta hormona es responsable del comportamiento sexual y de la libido del macho (Robson *et al.*, 2004). Cada función se realiza en compartimentos distintos pero interrelacionados entre sí; la producción hormonal tiene lugar, mayoritariamente, en el seno del tejido conjuntivo intersticial y la espermatogénesis se produce en los túbulos seminíferos (Tejerina, 2007)

## **El epidídimo**

Es un tubo sinuoso que se encuentra adosado al testículo mediante un fuerte ligamento. En el epidídimo se reconocen tres regiones anatómicas: cabeza, cuerpo, cola (Angelino, 2009) y cumplen la función de transporte, maduración, concentración y reservorio de espermatozoides (Gómez, 2013).

## **Conductos deferentes**

Comunican la cola del epidídimo con la uretra. Estas tienen la función de elaborar parte del volumen del eyaculado (Robson *et al.*, 2004).

## **Uretra**

La uretra es un órgano tubular que va desde la vejiga hasta el exterior, por el interior del pene. Su función es la de permitir la salida de la orina y del semen al exterior (Trujillo, 2008)

## **Glándulas anexas**

- **Vesículas o glándulas seminales**

Se localizan dorsalmente a la uretra, son dos glándulas compuestas tubulares su conducto de secreción y el conducto deferente tiene un conducto eyaculatorio común que se abre en la uretra (Tejerina, 2007).

- **Glándula prostática**

Esta glándula está ubicada cerca del cuello de la vejiga, su función es la producción de líquidos alcalinos con la finalidad de neutralizar la condición ácida de la uretra y de la vagina (Trujillo, 2008)

- **Glándulas bulbouretrales**

Se encuentran en posición dorsal a la uretra, la secreción de estas glándulas limpian y lubrican la uretra para el paso del eyaculado (Angelino, 2009).

## **Pene**

El pene es el órgano copulador del macho (Morillo *et al.*, 2012) mediante el cual se depositan los espermatozoides en el Interior de los órganos genitales de la hembra (Araujo, 2005). En la región ventral se forma una estructura en forma de “S” llamada flexura sigmoidea, su función es doblarse cuando el pene esta relajado permitiendo retraerlo y protegiéndolo del medio ambiente (Galina & Valencia, 2009).

### **2.3. Neuroendocrinología**

El Hipotálamo segrega (GnRh), esta estimula la secreción de LH y FSH de la hipófisis anterior. La FSH interviene en la espermiogénesis y la espermiación por su actividad en las células de Sertoli. La LH estimula las células intersticiales de Leydig y produce andrógenos, principalmente testosterona, la cual es vertida a la circulación sanguínea para el desarrollo de las características sexuales secundarias del macho y desarrollo y mantenimiento del aparato reproductor (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2013).

La testosterona es segregada en los túbulos seminíferos e interviene en el proceso de espermatogénesis y prolonga la vida de los espermatozoides en el epidídimo, además promueve el crecimiento, el desarrollo y la actividad secretora de los órganos sexuales accesorios del macho, como la próstata, las glándulas vesiculares, las glándulas bulbouretrales, el conducto deferente y los genitales externos (Barillas, 2005).

### **2.4. Estrés**

El estrés es un indicador de la pérdida de bienestar animal. (Romero *et al.*, 2011). Se define como una serie de respuestas frente a estímulos estresantes tanto internos como externos, que modifican la homeostasis de un individuo (Brousset *et al.*, 2005). Estos estímulos pueden provocar cambios medibles en las funciones de los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal (Romero *et al.*, 2011; Cobo *et al.*,



2012), dando origen a reacciones psicosomáticas o trastornos psicológicos (Illera *et al.*, 2007).

Después de la exposición al estrés, el sistema nervioso estimula un grupo de neuronas hipofisiotrópicas las que secretan hormonas liberadoras de corticotropina y arginina-vasopresina (CRH Y AVP), las cuales son liberadas a la circulación portal estimulando la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo, obteniendo como respuesta a este estímulo, la producción de glucocorticoides como el cortisol y la corticosterona, por parte de la corteza adrenal (Arias & Velapatiño, 2015).

La exposición de los animales al estrés puede inducir cambios en el comportamiento fisiológico e inmunológico (Palme, 2012). De hecho, el estrés prolongado reduce la productividad y el rendimiento de los animales (Khair *et al.*, 2011).

#### **2.4.1. Muestras para medir el estres**

- **Sangre**

Es la muestra más común (Romero *et al.*, 2011), sin embargo, tiene la desventaja de ser un método invasivo (Espinosa, 2014). Es importante tener en cuenta que después de la exposición al estrés el cortisol aumenta inmediatamente en la sangre siendo una limitante, ya que puede dificultar las mediciones del cortisol si no se toman en el momento adecuado (Bertulat y *et al.*, 2013). Por lo que se han investigado alternativas no invasivas (Palme, 2012), usando heces, saliva (Arias & Velapatiño, 2015) y orina (Brousset y *et al.*, 2005), pelo (Orihuela *et al.*, 2009), lo cual ha demostrado ser ventajoso para medir metabolitos de glucocorticoides como indicadores de estrés. (Bertulat *et al.*, 2013).

- **Saliva**

Los corticoides entran a la saliva por difusión pasiva, por lo que su concentración no es afectada por la tasa de flujo salival, utilizándola como una técnica no invasiva y se la puede realizar fácilmente antes o después de

una situación de estrés. (Leva *et al.*, 2013). Las mediciones de cortisol en saliva se han utilizado en los últimos años para valorar las reacciones al estrés en ganado lechero, algunos autores han demostrado que la concentración está directamente relacionada con la concentración de cortisol en plasma en: rumiantes, cerdos, perros y humanos (Leva *et al.*, 2012).

- **Heces**

Es un método no invasivo, los animales no necesitan ser capturados, y pueden obtenerse varias muestras fecales sin alterar su comportamiento o estado endócrino (Romero *et al.*, 2011). Los glucocorticoides excretados proporcionan un mejor resultado del estrés total que los glucocorticoides en sangre, pues se ven menos afectados por fluctuaciones episódicas o por la pulsatilidad de la secreción hormonal y reflejan además la secreción acumulativa de varias horas (Espinoza, 2014) (Palmer, 2005; Touma & Palme 2005).

#### **2.4.2. Biomarcadores para medir el estrés**

Existe varios biomarcadores que son utilizados para evaluar la respuesta de los animales frente a un factor estresante, pudiendo ser medidos como el cortisol y progesterona, albúmina, úrea, globulina, proteínas totales, entre otras (Espinoza, 2014).

El cortisol es uno de los indicadores más usados para medir el estrés que experimentan los animales (Bertulat *et al.*, 2013), al aumentar los niveles de cortisol en el cuerpo (Khair *et al.*, 2011). Por su lado, la progesterona también es secretada por las glándulas suprarrenales como parte de la respuesta al estrés (Genazzani *et al.*, 1998; Whitlock *et al.*, 2012) produciéndose un aumento a nivel sanguíneo tanto de cortisol como de progesterona cuando los animales están sometidos a un proceso de estrés como la electroeyaculación, (Welsh & Johnson, 1981).

#### **2.5. Cortisol**

El cortisol es una hormona esteroidea, producida por la glándula suprarrenal específicamente de su región cortical (Martínez, 2008). Interviene en el

metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas (Leira, 2012). Es utilizado frecuentemente en las evaluaciones de estrés, bienestar animal y además permite medir el dolor agudo (Ortiz de Montellano *et al.*, 2007).

### **2.5.1. Metabolismo del Cortisol**

Los glucocorticoides se metabolizan principalmente en el hígado (Stead *et al.*, 2000). En el intestino y en la sangre encontramos glucocorticoides sin metabolizar, ya que su excreción es principalmente por la orina y heces (Arias & Velapatiño, 2015; Brousset *et al.*, 2005), sin embargo, en las heces no se encuentran glucocorticoides de forma natural sino metabolizados (Palme *et al.*, 2013).

Su catabolismo se da principalmente en el hígado, pero también ocurre en el riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculo. Los glucocorticoides tienen una vida media en sangre de 80 a 120 minutos (Brousset *et al.*, 2005).

## **2.6. Progesterona**

La P4 es una hormona sintetizada por las células luteínicas del cuerpo lúteo (a partir de acetato y colesterol), por la corteza suprarrenal, por los testículos, y durante la preñez, por la placenta en grandes cantidades (Peñaranda & Vallejo, 2012).

### **2.6.1. Metabolismo y excreción**

La vida media de la P4 en sangre es alrededor de 5 minutos (Orizaba *et al.*, 2013), esta hormona es conjugada en el hígado y se elimina por la orina y las heces (Rodríguez, 1995). Después de su excreción este elemento sufre procesos de reducción u oxidación al contacto con el aire del medio ambiente y por efecto de algunos microorganismos fecales, (Alegría *et al.*, 2001), por esta razón que en nuestro estudio se tomaron las muestras fecales para el análisis tanto de metabolitos de cortisol como progesterona directamente desde el recto.

## 2.7. Inmunoanálisis de Cortisol y Progesterona

El metabolito de glucocorticoide más importantes en heces de ganado bovino es el 11,17-dioxoandrostando (Bertulat *et al.*, 2013; Morrow *et al.*, 2002), por lo que (Palme & Möstl, 1997; Möstl *et al.*, 2002) desarrollaron el inmunoanálisis enzimático (EIA) 11 oxoetiocolanolona con anticuerpos, los cuales reaccionan contra los metabolitos de cortisol y P4 en heces que tienen dicha estructura.

Los metabolitos de los esteroides se encuentran en el intestino y son transportados con la ingesta, por lo que, la velocidad del paso del duodeno al recto puede dar una estimación del tiempo en que aparecen en las heces (Brousset *et al.*, 2005), existiendo varios estudios donde se describe un intervalo de tiempo de 8 a 16 horas entre el aumento de la concentración en sangre y el aumento de la concentración de metabolitos de cortisol (11,17-DOA) en heces (Palme *et al.*, 2000; Morrow *et al.*, 2002; Palme, 2005; Bertulat, 2013).

## 2.8. Tranquilización en bovinos

Los tranquilizantes son sustancias que introducidas al organismo producen la pérdida de la sensibilidad sin pérdida de la conciencia, provocando un estado de quietud mental (Cano, 2007).

### 2.8.1. Usos

- Para realizar diferentes procedimientos diagnósticos o terapéuticos.
- Para controlar el estrés, ya que este perjudica su propio bienestar. (González, 2002).

### 2.8.2. Los tranquilizantes se dividen en:

- Derivados de las butiferas
- Benzodiacepinas.
- Derivados fenotiacínicos.
- Agonistas adrenérgicos alfa 2 (Clorhidrato de Xilacina)

### 2.8.3. Clorhidrato de Xilacina

Su nombre químico es clorhidrato de 5,6-dihidro-2-(2,6-xilidino H dimetil-fenilamina) -4H-I ,3-tiacina. Es un cristal incoloro, de sabor agrio, soluble en agua y estable en solución. Además posee un pH de 5.5 (Sumano & Ocampo, 2006).

#### - **Farmacodinamia**

La xilacina estimula los receptores periféricos  $\alpha_2$  presinápticos, induciendo la liberación de noradrenalina y también puede inducir un estímulo vagal vía central. Además de un efecto tranquilizante y analgésico, la xilacina tiene actividad relajante muscular ya que inhibe la transmisión intraneuronal de impulsos (Sumano & Ocampo, 2006).

#### - **Farmacocinética**

La dosis recomendada es de 0.2 a 0.8 mg/kg de PV y su efecto tranquilizante ocurre entre 5 a 10 minutos por vía IV y puede durar hasta una hora, y de 10 a 15 minutos por vía IM durando hasta dos horas; produce un efecto rápido y seguro provocando una excelente analgesia, sedación y relajación muscular (Cano, 2007).

**Absorción y Distribución:** Este fármaco es absorbido rápidamente después de la inyección intramuscular logrando concentraciones elevadas en el cerebro y riñón.

**Metabolismo:** El metabolismo es rápido, se realiza en el hígado.

**Vida media:** Es de 36 minutos en bovinos (Sumano & Ocampo, 2006).

**Excreción:** Se excreta principalmente por vía renal en un (70%), aunque una fracción es excretada por vía biliar (Pérez, 2010).

#### - **Eventos Medicamentosos Adversos**

Puede provocar bradicardia, también hipotermia, debido a que la xilacina altera el centro termorregulador (Sumano & Ocampo, 2006).

El riesgo de producir apneas aumenta (Cano, 2007).

Nunca administrarse intraarterialmente porque causa reacciones severas y posiblemente la muerte.

No se debe utilizar en animales con preñez avanzada, debido a que causa aborto.

Contraindicado en animales diabéticos (Pérez, 2010).

## 2.9. Valoración seminal

La valoración o evaluación seminal bovina se realiza mediante características macroscópicas y microscópicas.

### 2.9.1. Características Macroscópicas

Estas características son volumen y color.

- **Volumen:** Este se expresa en mililitros (ml), se realiza directamente en el tubo colector de semen. Normalmente el volumen del eyaculado de los toros es de aproximadamente 2 ml en los jóvenes y  $\geq 4$  ml en animales adultos, pudiendo llegar hasta 12 ml (Agüero, 2012).
- **Color:** Las muestras más densas son las mejores, estas son de color y aspecto cremoso. Mientras más diluidas su color varía desde el aspecto lechoso hasta completamente claro, como por ejemplo en animales con oligospermia o azoospermia (Morillo *et al.*, 2012). Se debe considerar que colores rojizos o amarillentos son anormales indicando contaminación de la muestra.

### 2.9.2. Características Microscópicas

- **Motilidad Masal:** Para evaluarla se coloca una gota pequeña de semen sobre un cubre objetos y se observa en un microscopio con el objetivo de 10X (Rego *et al.*, 2015). Se observa la velocidad del torbellino (ondas) y se valora subjetivamente en una escala de 0 al 5 (0= inmóvil o sin torbellino; 5 máximo) (Galina & Valencia, 2009)



0= nulo

1= escaso

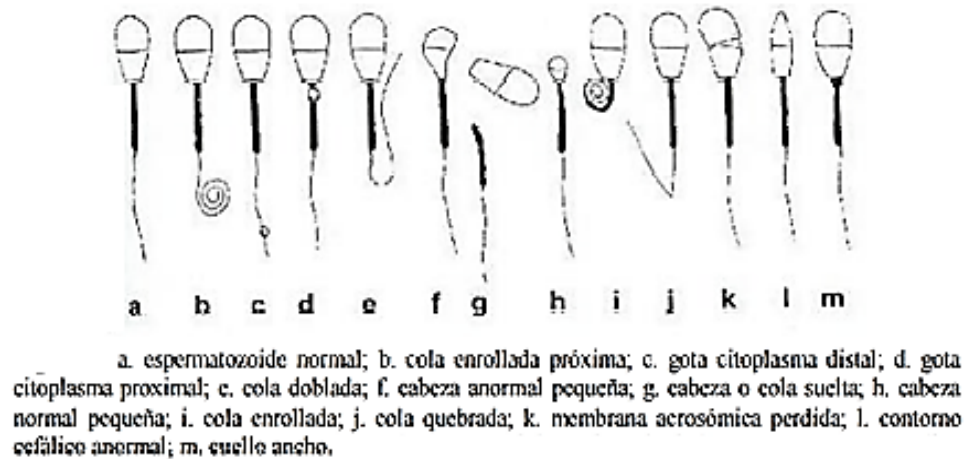
2=regular

3= bueno

4= muy bueno

5= excelente

- **Motilidad individual:** Se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico. Para ello, se coloca una alícuota de semen sobre una lámina portaobjetos y se cubre con una laminilla cubreobjetos. Se observa al microscopio con objetivo de 40x (Próspero & César, 2012). Un espermatozoide con motilidad progresiva individual es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta (Morillo *et al.*, 2012).
- **Concentración:** Se determina mediante el método del homocitómetro, utilizando la cámara de Neubauer (para conteo de glóbulos rojos). El conteo de los espermatozoides se realiza en cinco cuadrantes al azar y se saca un promedio, este se multiplica por  $10^7$  para obtener una concentración por  $\text{cm}^3$ . (Galarza, 2013)  
También se puede determinar por medio de un espectrofotómetro en el cual se coloca una muestra de semen en una microcubeta y este indica la cantidad de espermatozoides  $\times 10^6/\text{ml}$ . La concentración normal de semen bovino puede variar entre 800 y 1200 millones de espermatozoides por  $\text{cm}^3$  o ml (Angelino, 2009).
- **Morfología:** Para su evaluación se realiza un frotis con tinción de eosina-nigrosina y se observa bajo microscopio con el objetivo de 40x. Las muestras para ser criopreservadas deben tener una morfología normal mínima del 70% (Arieta *et al.*, 2014).



**Figura 1. Anormalidades de los espermatozoides**

**Fuente: Angelino, (2009)**

## 2.10. Procesamiento del semen

La crioconservación es una técnica que permite mantener viable el material biológico por tiempo indefinido. Es una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, manteniendo la biodiversidad y la conservación de una especie (Medina *et al.*, 2007), además ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético (Ramónez, 2013).

Este proceso de criopreservación incluye varias etapas, y el espermatozoide puede perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de ellas (Galarza, 2013).

### 2.10.1. Dilución

El semen es diluido para proteger los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Andrabi, 2009), con el fin de garantizar que conserven su vitalidad y poder fecundante. La proporción de diluyente dependerá la concentración del eyaculado y de la motilidad individual, constituyendo éste procedimiento muy importante para crear un medio buffer que provea un pH y osmolalidad adecuada y proteja los



espermatozoides durante el proceso de enfriamiento y congelación; también proporciona una protección antibiótica (Busch & Wabersk, 2007).

Asimismo, debido a que la cantidad necesaria de espermatozoides para fecundar un ovocito es mucho menor cuando el semen es depositado mediante la IA en el cuerpo del útero, la dilución permite incrementar muchas veces el número de dosis de semen y la cantidad de preñeces que se puede obtener por cada eyaculado (Andrabi, 2009).

Un diluyente debe contener sustancias iónicas y no iónicas que mantengan estables la osmolalidad y pH del diluyente (Buffer Tris la más utilizada), así como también azúcares simples como la glucosa o fructosa, que proporcionen energía al espermatozoide. Además, debe contener una fuente de lipoproteínas, como las presentes en la yema de huevo o leche descremada, que estabilizan la membrana plasmática de los espermatozoides y los protege del choque térmico. Asimismo, la adición de un criopreservante (como el glicerol u otras sustancias) es fundamental para evitar la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación (Morillo *et al.*, 2012). Finalmente, la presencia de antibióticos tales como la penicilina procaínica, ampicilina, sulfato de gentamicina o hidrocortidratado de lincomicina, es de suma importancia para prevenir el crecimiento bacteriano en las muestras de semen (Galarza, 2013).

### **2.10.2. Envasado y Sellado de las pajuelas**

Para el proceso de envasado, se utiliza una bomba de vacío la cual succiona el semen llenando las pajillas, (Durán, 2013). El sellado se realiza manualmente con alcohol polivinílico (Galarza, 2013). Es muy importante la formación de la burbuja de aire, para permitir la dilatación de la columna de semen durante la congelación y evitar que la pajuela estalle o expulse los tapones y el semen se contamine (Durán, 2013).

### **2.10.3. Fase inicial de enfriamiento**

Se reduce la temperatura del semen diluido de 37 °C a 5°C, controlando periódicamente durante 60 minutos (Morillo *et al.*, 2012). El espermatozoide

al ser enfriado rápidamente pierde la integridad de la membrana y sus funciones celulares, estas pueden reducirse utilizando velocidades de enfriamiento muy lentas cerca de los 4°C, sin embargo, este enfriamiento lento también genera lesiones, pero menos severas (Tejerina, 2007).

#### **2.10.4. Equilibración (estabilización)**

Consiste en mantener el semen diluido a 5 °C por un período de tres a seis horas para acondicionarlos a la posterior congelación (Morillo *et al.*, 2012).

Andrabi, (2009) menciona que un tiempo de equilibrio de una hora cuando el enfriamiento fue también por 60 minutos (enfriamiento lento) dan mejores resultados en la evaluación posdescongelación sobre todo en la motilidad espermática.

#### **2.10.5. Congelación**

Las velocidades óptimas de congelación para el esperma del toro están entre -80 y -120 °C/minuto (Busch & Wabersk, 2007). Para la congelación de las pajillas se lleva primero a vapores de nitrógeno durante 10 minutos, las cuales son suspendidas sobre una rampa colocada entre 4 - 4,5 cm por encima del nitrógeno líquido dentro de un contenedor con tapa (Durán, 2013; Jiménez *et al.*, 2012).

#### **2.10.6. Almacenamiento**

Al finalizar el procedimiento de congelación las pajillas son ubicadas dentro de un termo de almacenamiento y sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C hasta su evaluación (Medina *et al.*, 2007).

### **2.11. Descongelación**

Las pajillas generalmente son descongeladas en baño maría a 36 -37°C por 1 minuto, (Medina *et al.*, 2007; Galarza, 2013) posteriormente el semen descongelado es colocado en tubos ependorff de 1.5 ml e incubado a 36 °C durante la evaluación (Medina *et al.*, 2007).

### 2.11.1. Valoración Seminal Posdescongelación

Los parámetros evaluados son los mismos que se detallan en la valoración del semen fresco, adicionando para la descongelación el test de HOS. Este último consiste en suspender a los espermatozoides en un medio hipo-osmótico ocasionando un desequilibrio entre el medio extracelular y el intracelular produciendo un hinchamiento de la cola (López & Rivera, 2015) considerando este hecho como signo de integridad funcional de la membrana del espermatozoide (Peña, 2004)

Lo cual es sustentado por Campi *et al.*, (2004) quienes afirman que un HOST positivo está relacionado con la capacidad fecundante de una muestra seminal congelada.

Se realiza con 1.0 µl de semen agregado a la solución hiposmótica (Citrato de Na y fructosa) y se deja incubar a temperatura ambiente por 60 minutos, luego se evalúa al microscopio la cantidad de espermatozoides con colas enrolladas o hinchadas (Nur *et al.*, 2012).

### 2.12. Extracción de sangre

Es la obtención de una cantidad de sangre ya sea de una vena o arteria a través de un catéter para su posterior análisis en el laboratorio (Quintanilla *et al.*, 2011). La sangre se extrae de los animales para una gran variedad de propósitos (Morton *et al.*, 1993) como el diagnóstico de enfermedades, para obtener el certificado sanitario o el para el seguimiento de la respuesta a un tratamiento, etc (OIE, 2008).

En la mayoría de especies grandes, la extracción de muestras sanguíneas se las puede obtener mediante las venas yugular, abdominal o coccígea; aunque también es posible obtenerlas de las arterias y/o por punción cardiaca (Villanery, 2014). En medicina veterinaria, el procedimiento más común en animales grandes consiste en tomar 5 ml de sangre directamente en un frasco (Shalm, 1964).

Sin embargo, el muestreo frecuente incrementa el estrés en el animal siendo necesario considerar un método adecuado para la obtención de muestras sanguíneas (Morton *et al.*, 1993).

### **2.12.1. Sujeción y equipamiento**

En especies grandes la punción venosa se realiza sujetando físicamente al animal en una manga (Villanery, 2014). Tomando en cuenta que el estrés debe ser mínimo para no afectar la calidad de la muestra obtenida (Morton *et al.*, 1993).

### **2.12.2. Toma de la muestra**

Las muestras deben tomarse de forma aséptica y con cuidado con el fin de evitar lesiones en el operador y estrés en los animales (OIE, 2008). En animales de gran tamaño se puede obtener un flujo fácil de la vena yugular (Shalm, 1964), se puede rasurar o frotar la vena con alcohol etílico al 70% lo cual facilita la localización de la vena (Villanery, 2014). Una vez localizada se introduce la aguja y finalmente se recoge la sangre en un tubo. Una opción cuando existen animales nerviosos es la de utilizar agujas mariposa con tubo flexible, denominando a esta técnica canulación (Morton *et al.*, 1993).

Para las muestras de suero, la sangre debe dejarse a temperatura ambiente, protegida del calor o frío excesivos. La muestra se puede centrifugar a 1.000 rpm durante 10–15 minutos, y el suero se puede retirar con una pipeta (OIE, 2008).

### **2.12.3. Canulación**

La canulación es una técnica importante para la extracción de sangre debido a que reduce el estrés del muestreo múltiple. Las especies grandes parecen adaptarse bien a una canulación después de un periodo de entrenamiento (aclimatación) La canulación de corta duración consiste en insertar una aguja mariposa en la vena, luego la aguja se retira quedando la cánula in situ, la misma que es fijada con cinta o sutura. Finalmente se deja solución salina con heparina o cualquier anticoagulante en la cánula entre los muestreos, cualquiera que sea la vía elegida, hay que tener cuidado y



asegurarse que la cánula no se doble cuando el animal se mueva. (Morton *et al.*, 1993).

### **2.13. Heparina**

Es un anticoagulante natural presente en diversos tejidos y, en gran cantidad, en el hígado. La heparina impide la coagulación sanguínea porque impide la conversión de la protrombina en trombina (Shalm, 1964).



### 3. CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Biológicos

- 3 toros
- Personal

##### 3.1.2. Físicos

- Electroeyaculador Standard Precision
- Tubos Falcon y Eppendorf
- Microscopio
- Cámara de alta definición Accu-Scope modelo Excelis
- Cámara fotográfica
- Baño maría
- Placa térmica
- Espectrofotómetro Spermac – Minitube
- Placas porta objetos y cubre objetos
- Pipetas
- Tubos al vacío
- Guantes (látex y ginecológicos)
- Agujas (hipodérmicas)
- Jeringas
- Cooler
- Catlones nº 14-16
- Llaves de tres vías
- Extensiones de venoclisis de 1,20 metros
- Centrifuga
- Tanque de Nitrógeno líquido

##### 3.1.3. Químicos

- Tranquilizante (clorhidrato de xilacina al 2%)
- Eosina y Nigrosina

- Diluyente seminal (AndroMed ®)
- Citrato de Sodio+ Fructosa
- Metanol al 80%

### 3.2. Método

#### 3.2.1. El área de estudio

El estudio se realizó en la Granja experimental Irquis de la Universidad de Cuenca ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca-Ecuador. Esta parroquia se encuentra a 2.796 msnm, con una precipitación anual de 2500 mm y una temperatura promedio de 16°C.



**Figura 2. Ubicación de la Granja de Irquis de la U. de Cuenca**

**Fuente: (Climate- Data. Org, 2016)**

#### 3.2.2. Unidad de análisis

El estudio se realizó con 3 toros de fenotipo Criollo de los Andes Ecuatorianos, sexualmente maduros, con actividad sexual normal, clínicamente sanos y una condición corporal de 3 según la escala de Edmonson *et al.*, (1989). Se establecieron dos tratamientos, un testigo (T1) en el cual se realizó un MTR y electroeyaculación; y un tratamiento experimental (T2) en el cual se aplicó una dosis de tranquilizante previo a la colecta y luego se extrajo el semen mediante MTR y electroeyaculación. El semen obtenido fue analizado (características cuali-cuantitativas), procesado

y crioconservado en el Laboratorio de Biotecnología en la misma granja para su posterior análisis post-descongelación.

### **3.2.3. Metodología**

Previo al estudio se evaluó las condiciones sanitarias de los toros, teniendo como constancia resultados anteriores de tuberculosis y brucelosis debido a que estos animales pertenecían a un proyecto anterior. Para estandarización de la metodología, se hicieron varias sesiones para la obtención y evaluación de semen y se siguieron los procedimientos descritos a continuación.

#### **3.2.3.1 Preparación de reproductores**

Previo a la colecta seminal se realizó la limpieza del prepucio que consistió de un recorte del vello prepucial y aseo de la zona peneana con agua yodada; para esto los toros fueron introducidos en una manga de contención metálica con el fin de sujetarlos e inmovilizarlos.

#### **3.2.3.2 Aplicación del tranquilizante y toma de muestras de sangre**

El tranquilizante utilizado fue clorhidrato de Xilacina al 2% (Dormi-xyl ®) a una dosis de 0,025 mg/kg de PV vía I.M y fue aplicado 40 minutos antes de la sesión de electroeyaculación. Se esperó 20 min para que el tranquilizante actuase e inmediatamente se inició el muestreo sanguíneo en los tiempos siguientes: 20 y 5 minutos antes, al momento de la colecta y a los 5 y 20 minutos posteriores a la misma. Las muestras fueron recogidas en tubos estériles previamente rotulados, durante 9 sesiones, sumando con un total de 45 muestras sanguíneas. Para la extracción se canalizó la vena yugular dos horas antes de la colección de semen; el procedimiento consistió en la colocación de un catéter IV No. 16 rígido y un sistema de venoclisis de 1,20 metros de longitud el cual fue colocado en la parte dorsal del toro (Anexo 22). La finalidad de este procedimiento fue impedir que el animal tuviera contacto visual cuando se le extrajeran las muestras sanguíneas, y de esta manera evitar que esta maniobra alterara los niveles de cortisol y progesterona que presuntamente aumentarían con la extracción seminal.



Las muestras fueron colocadas en un cooler con hielo y llevadas al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en donde se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos. Luego de extraído el suero sanguíneo se colocó en tubos eppendorf previamente rotulados, que se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su respectivo análisis. Para el análisis de cortisol y progesterona, las muestras de sangre fueron enviadas al laboratorio CENBIOCLI ubicado en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, en donde se utilizó el analizador Cobas e411 para generar resultados precisos gracias a su tecnología ECLIA (electroquimioluminiscencia). Esta tecnología tiene alta sensibilidad analítica que permite amplios rangos de medición y volúmenes mínimos de muestra. Los resultados obtenidos fueron expresados en ng/ml y se tomó en cuenta los valores fisiológicos de cortisol (0 y 20 ng/ml) (Pargas *et al.*, 2014; Romero y *et al.*, 2011) y P4 (0,05-0,24 ng/ml) (Welsh & Johnson, 1981).

### **3.2.3.3 Obtención, extracción y análisis de metabolitos de cortisol y progesterona en heces**

Se tomaron muestras de heces en el momento que los toros llegaron a la manga con el fin de conocer el nivel de estrés que estos tenían previo a la electroeyaculación, y otra muestra a las 8 hs después de realizada la sesión para evaluar la presencia de metabolitos de cortisol y P4.

Las muestras se tomaron directamente del recto usando un guante desechable por cada animal en estudio (Bertulat *et al.*, 2013). Se tomaron 100 gramos de heces, se las homogenizó y se las colocó en una bolsa plástica, con el objetivo de prevenir variaciones en las concentraciones de metabolitos (Arias & Velapatiño, 2015). Las muestras fueron almacenadas en un congelador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Para la extracción de metabolitos de cortisol y P4, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se tomaron 60 gr de heces, luego se procedió a desecarlas en el microondas por 3 minutos y se pesaron, nuevamente se las colocó en el microondas por 1 min o por más tiempo

verificando su peso, hasta que estén completamente deshidratadas y luego se las trituró.

Fue necesario usar un diluyente en las muestras fecales, siendo el más utilizado en la mayoría de mamíferos el metanol al 80% (Palme *et al.*, 2013; Palme & Möstl, 1997), para esto se colocaron 5 ml de metanol junto con 200 mg de heces maceradas en un tubo graduado (Palme *et al.*, 2012; Morrow *et al.*, 2012) luego se homogenizaron en un vórtex durante 3 minutos y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo graduado y se volvieron a centrifugar durante 5 minutos más. Finalmente, se tomaron 500 ul del sobrenadante de cada muestra y se colocó en un eppendorf previamente rotulado, éste se dejó abierto para su evaporación total, quedando en el eppendorf un halo de color verde, lo cual se usó como material biológico para su posterior análisis.

Para el análisis de metabolitos de cortisol y P4 se enviaron 54 muestras al laboratorio del Dr. Rupert Palme (Departament of Biomedical Science/ Biochemistry University of Veterinary Medicine Vienna, Austria) quien utilizó el método de (EIA-11-oxoaetiocholanolone-Palme & Möstl, 1997) para cortisol y P4. Los resultados fueron expresados en ng/g.

#### **3.2.3.4 Colecta seminal**

Previo al inicio del experimento se efectuaron 4 colectas seminales con electroeyaculador por toro, para adaptamiento de la técnica y estandarización del protocolo.

Posteriormente se realizaron 9 sesiones de colección de semen por toro, obteniéndose un total de 27 eyaculados. Las sesiones se realizaron dos veces por semana (lunes y jueves). Se colectó el semen de los tres toros de tal manera que fueron asignados a cada tratamiento alternadamente en cada sesión (Anexo 19).

De esta manera se obtuvo un total de 27 eyaculados, que constó de 18 eyaculados con T1 y 9 eyaculados con T2. El proceso de colección de semen consistió en realizar un MTR de las glándulas sexuales accesorias

por el tiempo aproximado de 2 minutos por toro hasta que se observó la protrusión del pene y empezó a segregarse plasma seminal. Inmediatamente a este proceso se introdujo la sonda rectal del equipo de electroeyaculación.

El equipo de electroeyaculación usado fue SPE Electro-Ejaculator®, el cual consta de un tubo colector de semen adaptado a un cono de caucho, sonda rectal con dos electrodos en su parte ventral para transmitir las descargas eléctricas, y comprobador operacional de sistemas (SOC), cables de la sonda rectal, cargador de batería, conjunto colector y vial, estuche colector.

El tamaño de la sonda rectal utilizada fue 47.7 cm de largo y 10 cm de diámetro, los electrodos estaban separados por un ángulo de arco en el cuerpo de la sonda.

Una vez colocada la sonda rectal al control manual se aplicaron entre 10 a 20 estímulos progresivos, de tal manera que el estímulo siguiente fue subiendo 10 miliamperios. El intervalo entre cada estímulo fue entre 2 a 3 segundos con amperajes que variaron entre 100 y 300 miliamperios, hasta que se produjo la eyaculación, esto dependió de la respuesta de cada animal. Para la colecta del eyaculado se utilizó el estuche colector el cual sostiene un embudo de látex, en cuyo extremo se colocó un tubo graduado que recibió el eyaculado.

### **3.2.3.5 Evaluación del semen**

Las muestras de semen fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de biotecnología de la reproducción para evaluar su calidad, procesarlas y criopreservarlas. Cabe recalcar que para la evaluación seminal todas las muestras se mantuvieron sobre una placa térmica a una temperatura de 37°C, además se contó con una cámara de alta definición de marca Accu-Scope, modelo Excelis conectada a un microscopio.

- **Características macroscópicas**
  - **Volumen:** fue expresado en mililitros (ml), y se determinó directamente del tubo colector de semen.



- **Color:** Se analizó el color, de acuerdo al criterio de Zemjanis, (1970), quien clasifica el eyaculado según la concentración:  
Calidad 1: blanco amarillento (cremoso): mayor de 1000 millones esp/ml.  
Calidad 2: Blanco lechoso (opaco): entre 500 a 1000 millones esp/ml.  
Calidad 3: Blanco azulado (translúcido): entre 200 a 500 millones / ml.  
Calidad 4: Gris (translúcido): menor de 200 millones.
- **Características microscópicas**
  - **Motilidad masal:** para la evaluación se colocó una gota pequeña de semen (10  $\mu$ l) sobre un portaobjetos y se observó al microscopio. Se observó la velocidad del torbellino (ondas) a un aumento de 10x y se valoró subjetivamente en una escala de 0 al 5 (0= sin torbellino; 5= máximo torbellino).
  - **Motilidad individual progresiva (MIP):** para ello, se colocó una alícuota de semen sobre un portaobjetos y se la cubrió con una laminilla cubreobjeto. Se observó el movimiento progresivo de los espermatozoides de un punto a otro en una línea más o menos recta, y esta se expresó en porcentaje.
  - **Concentración:** La concentración se determinó por medio de un espectrofotómetro de marca Spermac–Minitube en el cual se colocó una alícuota de semen, y este nos indicó la cantidad de espermatozoides  $\times 10^6$ / ml.
  - **Vitalidad Espermática y anormalidades:** La vitalidad espermática (VE), anomalías totales (AT) y de cola (AC) fueron evaluadas por medio de un frotis después de haber mezclado 5  $\mu$ l de semen y 5  $\mu$ l de eosina-nigrosina en un portaobjetos durante 10 segundos. El frotis fue observado al microscopio con un lente de 10x contando un total de 200 células y expresado en porcentaje considerando como vivos a los espermatozoides sin colorear y muertos a los coloreados.

### 3.2.3.6 Procesamiento del semen y crioconservación

Para la dilución se utilizó el diluyente comercial AndroMed® y se envasó en pajuelas de 0.25 ml con una concentración de  $20 \times 10^6$ .

**AndroMed ®:** Compuesto a base de TRIS y lecitina de soya (proteína vegetal). Se hizo una relación de 1 en 5, una parte de diluyente AndroMed ® y cuatro partes de agua bidestilada. Todo a temperatura de 37 °C.

Para conocer la cantidad de pajuelas esperadas del volumen del eyaculado se aplicó la siguiente formula, siempre tomando en cuenta una concentración por pajuela de  $20 \times 10^6$ :

$$\text{Nº Pajuelas esperadas} = \frac{\text{Vol. x concentración x \% MIP}}{\text{X } 20^6 \text{ de espermatozoides por pajuela}}$$

La totalidad de espermatozoides por dosis estuvo suspendida en un volumen de 0,25 ml (pajuela), para conocer la cantidad de diluyente multiplicamos el número de pajuelas calculadas x 0,25 y a este resultado restamos el volumen del eyaculado como se ve en la siguiente formula:

$$\text{Diluyente Total} = (\text{Nº Pajuelas esperadas} \times 0,25 \text{ ml}) - (\text{Volumen Eyaculado})$$

Para elaborar 10 pajuelas por cada animal se realizó una regla de tres.

La dilución del semen se mantuvo a 37° C de temperatura para el envasado de las pajuelas que se hizo manualmente y estas fueron selladas con alcohol polivinílico. Se realizó el descenso de la temperatura de las pajuelas a 5 °C en un lapso de una hora en un refrigerador y luego se equilibró por dos horas para que el crioprotector penetrara al espermatozoide.

La criopreservación se realizó en vapores de nitrógeno líquido dentro de una cámara de flotación para crioconservación de espermatozoides; las pajuelas equilibradas previamente rotuladas fueron colocadas en una rampa a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por un tiempo de 10 minutos para luego dejarlas caer en el mismo y de esta manera alcanzar una temperatura de -196° C.

### 3.2.3.7 Evaluación posdescongelación

Se descongelaron 2 pajuelas por toro en un baño María a 37°C por 60 seg, y el contenido seminal de las pajuelas fue vaciado en un tubo eppendorf de 1 ml, para realizar los siguiente análisis: MIP (%), VE (%), anormalidades totales (AT, %), de cola (AC, %) y prueba de endósmosis de la membrana para evaluar su integridad a través de la prueba de HOS (5%).

Las pajuelas descongeladas que no presentaron motilidad alguna posterior a la descongelación fueron descartadas y no se incluyeron en el análisis estadístico.

La integridad de la membrana espermática mediante la prueba de HOS, que fue realizada colocando 10 µl de semen en 100 µl de una solución hiposmótica (fructosa anhidra: 0.675 g/l y citrato de sodio: 0.268g/l, en agua bidestilada, PO 55 mOsm/l) según lo descrito por Sánchez *et al.*, (2002). La mezcla se mantuvo en una estufa a 37°C por 60 minutos, luego se colocó una gota sobre un portaobjetos cubierta y se hizo un frotis y se observó al microscopio a un aumento de 10x. Se determinó la proporción de células que respondieron positivamente a esta prueba, considerándose HOS + a aquellos espermatozoides con colas enrolladas. Se realizó un conteo de 100 espermatozoides por muestra y el resultado fue expresado en porcentaje.

### 3.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se usó un diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos y 27 unidades experimentales T1 (n=18 eyaculados) y T2 (n= 9 eyaculados) y con tres toros reproductores que fueron considerados como un factor aleatorio en el análisis estadístico. Para el análisis posdescongelación se usaron 2 pajuelas por toro, pero como no se consideraron las pajuelas que tuvieron motilidad nula, solamente se tomaron en cuenta 47 pajuelas para el análisis.



Los resultados fueron sistematizados en el programa Excel y analizados con el software estadístico SPSS® versión 24.0. Los resultados de los parámetros de calidad espermática pre y posdescongelación (a excepción del color) fueron expresados en porcentajes, mostrándose los valores promedios  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ ).

Para el análisis de la variable color se realizó una tabla de contingencia que mostró la frecuencia y porcentajes según sus categorías y para evaluar el efecto del tranquilizante se usó una prueba estadística no paramétrica “U de Mann Withney.

Sin embargo, las variables de calidad seminal en fresco (Volumen, concentración, MM, MIP, VE y Anormalidades) y posdescongelación (MIP, VE, AC, AT y HOS) fueron analizadas con la prueba de Shapiro Wilk y Levene ( $P > 0,05$ ) para determinar la normalidad de datos e igualdad de varianzas, respectivamente; y para evaluar el efecto de la Xilacina considerándose la variable toro como factor aleatorio se usó un ANOVA y se aplicó la prueba “U de Mann Whitney” para las variables que no tuvieron una distribución normal.

Finalmente, la P4 y cortisol en sangre y heces fueron analizados su normalidad de datos e igualdad de varianzas con las pruebas de Shapiro Wilk y Levene, respectivamente; el efecto del tranquilizante fue evaluado por un ANOVA y en caso de no existir normalidad de datos se usó la prueba “U de Mann Whitney”.

#### 4. CAPITULO IV: RESULTADOS

##### 4.1 Evaluación de los parámetros de calidad espermática en semen fresco.

El parámetro cualitativo “Color” fue expresado de acuerdo en una tabla de contingencia (Tabla 1), que muestra la frecuencia y porcentaje, de las diferentes categorías. Se evaluó el efecto de la Xilacina por la prueba “U de Mann Withney” (Anexo 1) y se determinó que no existió diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos. Como se observa en la Tabla 1, el 33,3 % de las muestras seminales tuvieron un color blanco amarillento en ambos grupos experimentales, aunque en las demás categorías estas proporciones fueron numéricamente diferentes aunque estadísticamente similares.

**Tabla 1. Evaluación del color seminal con sus categorías en los tratamientos en estudio.**

Color de semen	Tratamientos		Total (n=27)
	T1	T2	
<b>Blanco amarillento (cremoso)</b>	% (n) 33,3 (6)	33,3 (3)	33,3 (9)
<b>Blanco lechoso (opaco)</b>	% (n) 44,4 (8)	22,2 (2)	37,0 (10)
<b>Blanco azulado (translúcido)</b>	% (n) 22,2 (4)	33,3 (3)	25,9 (7)
<b>Gris (translúcido)</b>	% (n) 0,0 (0)	11,1 (1)	3,7 (1)
<b>Total</b>	% (n) 100,0 (18)	100,0 (9)	27

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna y por cada categoría de color de semen muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), según la prueba estadística “U de Mann Withney”

Se evaluó el efecto de la Xilacina mediante un ANOVA tomando como factor aleatorio el Toro, variable que permitiría controlar el efecto del animal en el experimento, encontrando diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) en volumen y concentración. En las demás variables, el factor toro no tuvo ningún efecto ( $P > 0,05$ ) (Anexo 4).



Mediante la prueba “U de Mann Withney” (Anexo 5) se determinó que no existió diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos en ningún parámetro de calidad espermática. Como se aprecia en la Tabla 2 las características espermáticas mostraron una diferencia numérica mínima entre ambos tratamientos.

**Tabla 2. Parámetros de calidad espermática en semen fresco en ambos tratamientos.**

Parámetro de calidad espermática en semen fresco	Tratamiento	
	T1	T2
	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	$\bar{X} \pm \text{EEM}$
Volumen (ml)	3,8 $\pm$ 0,31	3,3 $\pm$ 0,29
Concentración (esp x 10 <sup>6</sup> esp)	849,8 $\pm$ 97,21	715,9 $\pm$ 134,47
Motilidad Masal (MM)	4,4 $\pm$ 0,14	4,1 $\pm$ 0,32
Motilidad individual progresiva –MIP (%)	87,5 $\pm$ 1,36	83,9 $\pm$ 2,47
Anormalidades Morfológicas (AT, %)	22,5 $\pm$ 2,27	24,2 $\pm$ 3,46
Vitalidad (V, %)	79,3 $\pm$ 2,61	81,3 $\pm$ 2,98

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna y para cada parámetro de calidad seminal, muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Según ANOVA y U de Mann Withney.

#### 4.2 Evaluación de los parámetros de calidad espermática en semen posdescongelado.

Según el estadístico “U de Mann Whitney” (Anexo 9) se encontró diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) únicamente en el parámetro HOS, el cual tuvo un porcentaje ligeramente más alto cuando no se aplicó el tranquilizante (T1) en comparación a cuando se administró el mismo (T2); (Tabla 3).

**Tabla 3. Parámetros de calidad espermática posdescongelación por tratamiento.**

Parámetros de calidad espermática Posdescongelación			Tratamiento	
			T1	T2
			$\bar{X} \pm \text{EEM}$	$\bar{X} \pm \text{EEM}$
Motilidad individual progresiva MIP (%)			61,7 $\pm$ 3,61 <sup>a</sup>	62,1 $\pm$ 4,62 <sup>a</sup>
Vitalidad (V, %)			71,2 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	72,4 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>
Anormalidades Morfológicas	Totales (AT, %)		22,8 $\pm$ 1,60 <sup>a</sup>	24,4 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>
	Cola (AC, %)		24,9 $\pm$ 1,60 <sup>a</sup>	26,3 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>
HOS test (%)			26,5 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	24,8 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna y para cada parámetro de calidad seminal, muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Según ANOVA y U de Mann Withney

### 4.3 Evaluación del cortisol y progesterona

#### 4.3.1 Evaluación en sangre

Según el ANOVA (Anexo 12) los valores de cortisol sérico (ng/ml) fueron más altos ( $P < 0,05$ ) a los 5 minutos antes de la colecta de semen para T2 en comparación con T1 ( $3,5 \pm 0,09$  vs  $1,1 \pm 0,28$  ng/ml, respectivamente). También existieron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) muy notorias a los 5 min posteriores a la colecta, determinándose concentraciones inferiores ( $P < 0,05$ ) de esta hormona al aplicarse el tranquilizante ( $1,2 \pm 0,39$  ng/ml) comparado con el grupo testigo ( $3,1 \pm 0,50$  ng/ml).

En los demás tiempos de evaluación no existieron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos. Sin embargo, al momento de realizarse las colectas (0 minutos) se detectó una tendencia estadística ( $P = 0,076$ ) en la concentración de cortisol entre ambos tratamientos, ya que en aquellas en las que se aplicó tranquilizante (T2) este valor fue cuatro veces menor que en las que no se aplicó (Tabla 4).

**Tabla 4. Evaluación del Cortisol sérico de los animales en estudio.**

Tratamientos	Tiempo de evaluación del cortisol sérico (ng/ml)				
	20 min antes	5 min antes	0 min	5 min después	20 minutos después
	$\bar{X} \pm \text{EET}$	$\bar{X} \pm \text{EET}$	$\bar{X} \pm \text{EET}$	$\bar{X} \pm \text{EET}$	$\bar{X} \pm \text{EET}$
<b>T1</b>	1,3 $\pm$ 0,29	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,28<sup>a</sup></b>	2,0 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,50<sup>c</sup></b>	1,3 $\pm$ 0,49
<b>T2</b>	1,4 $\pm$ 1,02	<b>3,5 <math>\pm</math> 0,09<sup>b</sup></b>	0,5 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	<b>1,2 <math>\pm</math> 0,39<sup>d</sup></b>	1,4 $\pm$ 0,45

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.  
<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas <sup>a,b</sup> (P < 0,01); <sup>b,c</sup> (P=0,076); <sup>c,d</sup> (P  $\leq$  0,05) según ANOVA y U de Mann Whitney.

Al analizar los valores de P4 sérico (ng/ml), y según la prueba “U de Mann Whitney” (Anexo 15), se encontraron diferencias estadísticas (P < 0,05) a los 5 minutos posteriores a la colectas de semen, obteniéndose una concentración de P4 cuatro veces más baja en el grupo tratado que en el grupo control (0,4 $\pm$  0,02 versus 0,5 $\pm$  0,08 ng/ml, respectivamente) (Tabla 5).

**Tabla 5. Resultados del Análisis de P4 sanguínea de los toros en estudio.**

Tratamiento	Tiempo de toma de las muestras				
	20 min Antes	5 min antes	0 min	5 min después	20 min después
	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$
<b>T1</b>	0,4 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ ,03	<b>0,5<math>\pm</math> 0,08<sup>a</sup></b>	0,4 $\pm$ 0,05
<b>T2</b>	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,13	0,4 $\pm$ 0,08	<b>0,4<math>\pm</math> 0,02<sup>b</sup></b>	0,3 $\pm$ 0,01

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.  
<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (P < 0,05), según ANOVA y U de Mann Whitney.

#### 4.3.2 Evaluación en heces

Como se indica en la Tabla 6, los valores promedios de cortisol en heces analizados mediante ANOVA (Anexo 16) antes de la colecta no mostraron diferencias estadísticas (P > 0,05); sin embargo, luego de transcurridas 8

horas de la misma, se observó valores inferiores ( $P < 0,05$ ) de cortisol al aplicar el tranquilizante en comparación al testigo ( $31,4 \pm 9,81$  versus  $74,3 \pm 8,68$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6. Resultados de la evaluación de metabolitos de Cortisol en heces.**

Tratamiento	Tiempo de toma de las muestras	
	Antes de la colecta	8 hs después
	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$
<b>T1</b>	$32,7 \pm 9,37$	<b><math>74,3 \pm 8,68^a</math></b>
<b>T2</b>	$28,7 \pm 5,95$	<b><math>31,4 \pm 9,81^b</math></b>

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.  
<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna y para cada variable indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

Los valores promedios de P4 en heces analizados mediante ANOVA (Anexo 17) antes de la colecta no mostraron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ); sin embargo, como indica la Tabla 7, a las 8 horas posteriores de la colecta seminal los valores de P4 fueron 1,67 veces mayores ( $P < 0,05$ ) en T1 (sin tranquilizante) que en T2 (con tranquilizante).

**Tabla 7. Resultados de la evaluación de Progesterona (ng/g) en heces.**

Tratamiento	Tiempo de toma de las muestras	
	Antes de colecta	8 hs después
	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$
<b>T1</b>	$142,0 \pm 16,28$	<b><math>199,8 \pm 21,12^a</math></b>
<b>T2</b>	$137,9 \pm 27,22$	<b><math>119,6 \pm 22,36^b</math></b>

T1= sin tranquilizante; T2= con tranquilizante.  
<sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada columna y para cada variable indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), según ANOVA

## 5. CAPITULO V: DISCUSIÓN

El método de electroeyaculación se ha utilizado como método de colecta seminal en diferentes especies desde hace varios años. Sin embargo, el estrés producido por esta técnica se ha convertido en un problema para el bienestar animal pudiendo afectar las características seminales, por esta razón se ha desarrollado esta investigación.

El presente estudio se enfocó en el uso de un tranquilizante (Clorhidrato de Xilacina al 2%), con la finalidad de disminuir el estrés generado al momento de la colecta seminal por electroeyaculación, el cual fue evaluado mediante la determinación de la concentración de cortisol, P4 en sangre y en heces. Así mismo, se realizó la valoración de las características cualitativas y cuantitativas tanto en semen fresco como en el posdescongelado, y el efecto de la aplicación de un tranquilizante en los toros sobre las mismas.

### 5.1. Características seminales en fresco

En cuanto a las características cuali-cuantitativas de semen fresco no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) comportándose de igual manera con y sin tranquilizante, esto coincide con los resultados obtenidos por Toosi *et al.*, (2013) quienes evaluaron en 6 toros bisontes, el efecto de la aplicación de un tranquilizante neuroléptico de larga acción (LAN) como el Palmitato de pipotiazina, previo a la colecta con electroeyaculación con un objetivo similar al de este estudio, es decir reducir el estrés y mejorar la calidad del semen. Ellos utilizaron dos dosis de este tranquilizante (100 y 200 mg), sin encontrar diferencias significativas  $P > 0,05$  al aplicar 100 mg, sin embargo, al aplicar 200 mg obtuvieron diferencias significativas en algunos de los parámetros evaluados MM ( $75,1 \pm 2,2\%$  vs.  $63,6 \pm 3,3\%$ ) y MIP ( $71,7 \pm 2,3\%$  vs.  $59,8 \pm 3,4\%$ ) en comparación al grupo control.

### 5.2. Características seminales posdescongelación

En cuanto a la evaluación de las características seminales posteriores a la descongelación, se determinó que hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), únicamente para la variable HOS, siendo mayor para T1 en comparación

con T2. Esto posiblemente puede deberse a que según Correa y Zavos (1994) y Bedoya et al. (2003) el proceso de congelación y descongelación daña la membrana espermática causando pérdida de la permeabilidad e impidiendo que los espermatozoides reaccionen al test de HOS.

Asimismo, (Bedoya *et al.*, 2003) evaluaron la permeabilidad espermática y concluyeron que existió variabilidad entre razas al momento de reaccionar a la prueba de HOST.

### **5.3. Niveles plasmáticos de cortisol**

En este estudio, a los 5 min previo a la electroeyaculación se determinó un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) del cortisol plasmático en los animales tratados vs. los no tratados ( $3,52 \pm 0,09$  vs  $1,12 \pm 0,28$  ng/ml), esto es posible ya que la sujeción y posiblemente la misma aplicación del tranquilizante (I.M.) generó una respuesta de estrés manifestada con el aumento de los niveles de cortisol. Esto es corroborado por De la Sota (2004) quien indica que el ganado vacuno en algunos casos puede mantenerse en calma al ser manipulados en la manga, mientras que otros pueden desencadenar un miedo intenso, por lo tanto, los niveles de cortisol se elevan; existiendo grandes diferencias individuales en la forma en que los animales reacciona al manejo y a la restricción de movimientos (Grandin, 2000).

Es importante también destacar que existe numerosos problemas que se han asociado con la medición de los niveles de hormonas ligadas al estrés, especialmente en las muestras de sangre, ya que la secreción de cortisol ocurre en forma pulsátil produciendo cambios en la concentración de hasta 10 veces en un periodo de pocos minutos, por ello, los niveles basales presentan una gran variabilidad entre y dentro individuos. Por todo esto, la interpretación de la mayoría de los parámetros endócrinos basados en muestras aisladas pueden llevar a graves errores de interpretación (Palme et al. 2005). Esta información conduce a que sea poco explicable desde un punto de vista fisiológico las respuestas halladas, en este caso en las muestras de sangre obtenidas.

Los resultados de este estudio indican que aunque la diferencia no fue significativa, probablemente debido a la variabilidad e insuficiente números de colectas por grupo experimental, hubo una tendencia estadística ( $P=0,076$ ) en la concentración de cortisol entre el grupo tratado y control, que fue numéricamente importante ya que en las colectas en que los toros fueron tranquilizados la concentración de cortisol fue 4 veces menor que en las oportunidades en que no se aplicó el fármaco (Tabla 5).

Sin embargo, a los 5 minutos después de la electroeyaculación la concentración de cortisol circulante fue estadísticamente inferior ( $P < 0,05$ ) al aplicarse el tranquilizante ( $1,2 \pm 0,39$  vs  $3,1 \pm 0,50$  para el grupo tratado y control respectivamente). Esto coincide con lo expuesto por Orihuela et al. (2009), quienes llevaron a cabo una investigación para medir el bienestar animal mediante la medición de cortisol en muestras de lana de carneros, en grupos de animales que recibieron una combinación de anestésico y tranquilizante (ketamina 1 mg/kg y xilacina 0,02 mg/kg), durante la electroeyaculación. Las muestras que fueron recogidas en diferentes tiempos indicaron un incremento ( $P < 0,05$ ) del cortisol a los 20 minutos en los carneros no tratados ( $161,6 \pm 14,37$  ng/ml) en comparación con los recibieron la combinación de fármacos ( $110,6 \pm 11,74$  ng/ml).

De igual manera, los resultados de este estudio coinciden con la investigación de Ortiz de Montellano et al., (2007) y Whitlock et al., (2012) realizadas en chivos y toros respectivamente. A pesar de que ellos no utilizan tranquilizante los niveles de cortisol se ven elevados cuando se realiza electroeyaculación en comparación al testigo.

#### **5.4. Niveles plasmáticos de P4**

Cooper et al., (1995) y Whitlock et al., (2012), recomiendan medir los niveles de progesterona para evaluar el desconfort en los animales, debido a que esta hormona es un indicador de estrés ya que es secretada por la glándula adrenal al igual que el cortisol.

Los niveles séricos de progesterona mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) a los 5 minutos posteriores a la electroeyaculación siendo menores

para T2 que para T1 ( $0,4 \pm 0,02$  ng/ml vs.  $0,5 \pm 0,08$  ng/ml) respectivamente, lo cual indica el efecto del tranquilizantes en estos valores. Estos resultados pueden compararse con investigaciones cuyo objetivo fue el mismo. Por ejemplo, Etson *et al.*, (2004) realizaron un estudio en 10 toros Hereford aplicando anestésico epidural (lidocaína) caudal previo a la electroeyaculación, y compararon varios tratamientos, y al igual que en este estudio tomaron muestras sanguíneas y reportaron una reducción ( $P < 0,05$ ) en la concentración de P4 a los 5, 20 y 40 min después de la electroeyaculación en los toros tratados con anestésico ( $0,18$  ng/ml) comparado a los no tratados ( $0,31$  ng/ml) Por el contrario, Falk *et al.* (2001) no encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los niveles de P4 entre los toros sometidos a electroeyaculación y tratados con lidocaína y los no tratados. Cabe recalcar que el fármaco utilizado en estos trabajos fue diferente (lidocaína: anestésico local) al usado en este estudio.

### 5.5. Cortisol en heces

Estudios previos indican que en el ganado vacuno las concentraciones fecales de metabolitos de cortisol muestran la cantidad total excretada, por lo tanto reflejan los patrones de secreción de cortisol con mayor exactitud que las concentraciones en sangre (Palme *et al.*, 2005).

En cuanto a metabolitos de cortisol en heces se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a las 8 horas posteriores a la electroeyaculación, con menor concentración para el grupo de colecciones con tranquilizante ( $31,35 \pm 9,81$  ng/g) en comparación con el grupo sin tranquilizante ( $74,30 \pm 8,68$  ng/g), Estos datos no coinciden con lo expuesto por Merl *et al.*, (2000) quienes utilizaron 10 sementales a los cuales se los castró bajo anestesia general, con la finalidad de valorar el estrés midiendo los metabolitos de cortisol en heces, las muestras fueron recogidas previo a la castración, y durante 10 días posteriores a esta, mostrando diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) al comparar las muestras iniciales ( $10.5$  nmol/kg) frente a los días 1 ( $26.2$  nmol/kg) y 2 ( $50.0$  nmol/kg), luego del día 3 los niveles se estabilizaron, esto puede deberse al trauma posoperatorio que estuvieron sometidos estos animales.



## 5.6. P4 en heces

Con respecto a los resultados de P4 existió diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a las 8 horas posteriores a la electroeyaculación, observándose menores concentraciones en los animales que recibieron tranquilizante ( $119,6 \pm 22,36$ ) frente a los que no lo recibieron ( $199,8 \pm 21,12$ ). En la literatura existente no se encuentran datos relacionados al uso de un tranquilizante (Xilacina) y su efecto en los niveles de P4 en muestras fecales, con el objetivo de reducir el estrés de los animales.

Ahora bien, en la presente investigación se pudo comprobar que existió un efecto positivo al aplicar la Xilacina al 2% a los toros, ya que los niveles de P4 se redujeron significativamente luego de la electroeyaculación. Esta es la primera información existente sobre este tema, siendo un aporte importante debido a que esta metodología es fiable y no invasiva al momento de evaluar el estrés, evitando una medición de forma incorrecta, lo cual es sustentado por Lasley & Kirkpatrick (1991) y Harper & Austad, (2000), quienes indicaron que el empleo de muestras fecales son útiles cuando los estudios son prolongados o la posibilidad de tomar muestras de sangre es limitada.

Además la concentración de metabolitos es de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor que la de los esteroides parentales en sangre. (Lasley & Kirkpatrick 1991). Ya que las cantidades que se eliminan en las excretas es el resultado de la producción acumulada, no así en la sangre en donde existe mucha variación en la concentración (Harper & Austad 2000, Goyman 2005).



## 6. CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- El uso de tranquilizante (clorhidrato de xilacina al 2%), no mejoró las características cuali-cuantitativas del semen fresco bovino obtenido mediante el método de electroeyaculación.
- En las muestras de semen posdescongelado obtenidas en colectas en las que se usó tranquilizante, solamente la variable HOST fue estadísticamente diferente entre tratamientos.
- Los niveles de cortisol sérico fueron estadísticamente diferentes únicamente a los 5 minutos antes y 5 minutos después de la colecta seminal, mientras que con respecto a la progesterona, fueron estadísticamente diferentes solamente a los 5 minutos después de la misma.
- Las concentraciones fecales de P4 y cortisol a las 8 horas posteriores de la colecta, disminuyeron significativamente luego de la aplicación del tranquilizante.
- De acuerdo a los resultados de este estudio decimos que la aplicación de un tranquilizante (clorhidrato de xilacina al 2%) a los toros colectados con electroeyaculador, mejoró las condiciones de colecta seminal por electroeyaculación, al reducir el estrés generado por este procedimiento.



## 7. RECOMENDACIONES

- Para una próxima investigación se sugiere aumentar el número de colectas seminales o el número de animales en estudio, con el fin de que existan mayores datos y se reduzca el error estándar.
- Para el desarrollo de la técnica de electroeyaculación es necesario que los toros reciban un entrenamiento previo para reducir el riesgo de accidentes y facilitar el manejo del operador debidamente capacitado.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, G. (2012). Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el analizador seminal computarizado (CASA).
- Alegría, T., Leyva, V., & Franco, J. (2001). Niveles de progesterona sérica y fecal durante el ciclo estral y la gestación temprana en yeguas. *Rev Inv Vet Perú*, 12(1), 85-92.
- Andrabi, S. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, 44(3), 552–569.
- Angelino, J. (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos.
- Araujo, Á. (2005). Descripción del Sistema Reproductor Masculino. En línea [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201107/Exe\\_201107\\_subir%201/Exe\\_201107/leccin\\_1\\_\\_descripcin\\_del\\_sistema\\_reproductor\\_masculino.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201107/Exe_201107_subir%201/Exe_201107/leccin_1__descripcin_del_sistema_reproductor_masculino.html)
- Arias, N., & Velapatiño, B. (2015). Cortisol como Indicador Fiable del Estrés en Alpacas y Llamas. *Rev Inv Vet Perú*, 26(1), 1–8.
- Arieta, R., Fernández, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Rev Elec Vet*, 15(5), 1–8.
- Barbaccia, M., Serra, M., Purdy, R., & Biggio, G. (2001). Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol*. 2001; 46: 243–272
- Barillas, A. (2005). Efectos de la aplicación de undecilinato de boldenona sobre la calidad espermática en bovinos para su utilización como sementales.
- Barrios, D. (2002). Consideraciones básicas sobre la extracción de semen de toro mediante electroeyaculador. En línea [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/17-consideraciones.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/17-consideraciones.pdf).
- Barth, A., Arteaga, A., Brito, L., & Palmer, C. (2004). Use of internal artificial



vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Anim Reprod Sci*, 84(3–4), 315–325.

Bedoya, N., Araque, N. V., Rivera, M., Correa, G., & Luís, T. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Rev Fac Nat Agr. Medellín*, 56, 1983–1997.

Berndtson, W., Igboeli, G. (1988). Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. *J Reprod Fert*, 82, 467–475.

Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., Suthar, V., Möstl, E., Isaka, N., & Heuwieser, W. (2013). Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields. *J Dairy Sci*, 96(6), 3774–87.

Brousset, D., Galindo, F., Valdez, R., Romano, M., & Schuneman de Aluja, A. (2005). Artículos de revisión. *Rev Vet Méx*, 36(3), 325–337.

Busch, W., Wabersky, D. (2007) Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica (pp. 148-151)

Campi, S., Blasi, C., Fischman, M., García, C., & Cisale, H. (2004). Comparación entre dos test de funcionalidad de membrana para valorar semen de verraco. *Vet Arg*, 21(206), 421-426.

Cano, P. (2007). Tranquilización en bovinos. En línea <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/archivos/TRANQUILIZACION EN BOVINOS.doc>.

Climate- Data. Org. (2016). Clima: Victoria del Portete. En línea <http://es.climate-data.org/location/181783/>



- Cobo, C., Varón, L., & Vélez, J. (2012). Indicadores conductuales de bienestar animal durante el presacrificio bovino. *Rev Vet Zoot U Caldas*, 6(2), 112–124.
- Cooper, C., Evans, A., Cook, S., & Rawlings, N. (1995). Cortisol, progesterone and B-endorphin response to stress in calves. *Canadian J Anim Sci*, 75(June 1994), 197–201.
- Correa, J., & Zavos, P. (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed Bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 351–360.
- Cruz, F., Lohn, L., Marinho, L., Mezzalira, J., Neto, S., Martins, L., Mezzalira, A. (2011). Internal artificial vagina (IAV) to assess breeding behavior of young *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci*, 126(3–4), 157–161.
- De la Sota, M. (2004). *Manual de Bienestar Animal*. Buenos Aires.
- Duarte, C. (2008). Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo.
- Durán, F. (2013). Inseminación y transferencia de embriones en animales de granja. Primera edición. Editorial D`vinni S.A. Colombia (pp 26- 31).
- Edmonson, A., Lean, I., Weaver, L., Faver, T., Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 1972 :(1):68-78
- Espinosa, A. (2014). Evaluación del nivel de estrés en leoncillos (*Callithrix pygmaea*) mediante la medición de cortisol en heces.
- Etson, C., Waldner, C., & Barth, A. (2004). Evaluation of a segmented rectal probe and caudal epidural anesthesia for electroejaculation of bulls. *Canadian Vet J*, 45(3), 235–240.
- Falk, A., Waldner, C., Cotter, B., Gudmundson, J., & Barth, A. (2001). Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during electroejaculation. *Canadian Vet J*, 42, 116–120.



- Fayed, A., Zakaria, A., Hedaya, S., & El-Ashmawy, I. (1994). Effects of Xylazine (alpha 2-adrenergic agonist) on the stress response to immobilization and heat in rats. *Albanian J Agric Sci*, 7(3), 397–400.
- Galarza, A. (2013). Eficacia de dos diluyentes: Tris + lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador.
- Galina, C., & Valencia, J., (2009). Inseminación artificial en el bovino. México D.F. 2 ed. Limusa (pp. 217-219).
- Genazzani, A., Petraglia, F., Bernardi, F., Casarosa, E., Salvestroni, C., Tonetti, A., Luisi, M. (1998). Circulating levels of allopregnanolone in humans: Gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(6), 2099–2103.
- Goymann, W., (2005). Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validations, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann N Y Acad Sci*, 1046: 35–53.
- Gómez, C. (2013). Evaluación de la efectividad de un electroeyaculador experimental comparado a uno de marca comercial en ovinos.
- González. (2002). Tranquilización y sedación. En línea: <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Terapeutica/TRANQUILIZACION.htm>
- Grandin, T. (2000). Principios de comportamiento animal para el manejo de bovinos y otros herbívoros en condiciones extensivas. Cap, 5, 63-85.
- Harper, J., & Austad, S. (2013). Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents. *Chicago J*, 73(1), 12–22.



- Ibrahim, M., (1988). Influence of oxytocin and prostaglandin on semen characteristics and process of ejaculation in buffalo bulls. *Acta Vet Hung*, 82, 3–10.
- Illera, J., Gil, F., & Silván, G. (2007). Regulación neuroendocrina del estrés y dolor en el toro de lidia (*bos taurus* L.): estudio preliminar. *Rev Complutense de Ciencias Vet*, 2, 1–6.
- Jiménez, P., Ramón, M., García, O., Maroto, A., del Olmo, E., Pérez, M., & Soler, A. (2012). Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci*, 132(1–2), 88–95.
- Khair, M., Yusoff, R., Omar, M., & Haron, A. (2011). Stress Levels in Bulls during and after Electroejaculation. *U Putra Malaysia KM E-J*, 37–40.
- Lasley, B.L. & J.F. Kirkpatrick. (1991). Monitoring ovarian function in captive and freeranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J Zool Wildl Med*, 22: 23-31.
- Leira, M. (2012). Manual de bases biológicas del comportamiento humano.
- Leva, P., García, M., Rey, F., Sosa, J., Toffoli, G., & Valtorta, S. (2012). Cortisol en saliva en terneros lechales en la cuenca lechera santafesina. *Rev FAVE - Ciencias Agrarias*, 11(1), 7–17.
- Leva, P., García, M., & Toffoli, G. (2013). Bienestar en terneros lechales en dos sistemas de crianza, estudio de caso en la cuenca lechera santafesina. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias*, 12(1–2), 117–135.
- López, J. (2014). Colecta de semen en las distintas especies. En línea <http://reproduccion-veterinaria.webnode.com.uy/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/colecta-de-semen/>





López, N., & Rivera, D. (2015). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.*

Martínez, I. (2008). Hormonas Adrenocorticales 2008.

Medina, V., Sanchez, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de analisis espermatico asistido por computador (CASA). *Rev Orinoquia*, 11(1), 75–86.

Merl, S., Scherzer, S., Palme, R., & Möstl, E. (2000). Pain causes increased concentrations of glucocorticoid metabolites in horse feces. *J Equine Vet Sci*, 20(9), 586–590.

Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino.

Morrow, C., Kolver, E., Verkerk, G., & Matthews, L. (2002). Fecal Glucocorticoid Metabolites as a Measure of Adrenal Activity in Dairy Cattle. *General and Comparative Endocrinology*, 126(2), 229–241. <http://doi.org/10.1006/gcen.2002.7797>

Morton, D., Abbot, D., Barclay, R., Close, B., Ewbank, R., Gask, D., Jennings, M. (1993). Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio. *Laboratory Animals*, 27(1), 1–22.

Möstl, E., Maggs, J., Schrötter, G., Besenfelder, U., & Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Vet Research Comm*, 26(2), 127–139.

Nur, Z., Seven, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C., ... Soyulu, M. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43(1), 31–38.

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). Información general. En



línea [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/1.01.01. Recogida y env% C3% ADo de muestras.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.01.Recogida_y_env%C3%ADo_de_muestras.pdf).

- Orihuela, A., Aguirre, V., Hernandez, C., Flores, I., & Vazquez, R. (2009). Effect of anesthesia on welfare aspects of hair sheep (*Ovis aries*) during electro-ejaculation. *J Anim Vet Adv*.
- Orizaba, B., Alba, G., & Ocharán, M. (2013). Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Méx*, 80(1), 59–66.
- Ortiz de Montellano, M., Galindo, F., Cavazos, E., Aguayo, A., Torres, J., & Orihuela, A. (2007). Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small Rumin Res*, 69(1–3), 228–231.
- Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim Welfare*, 21(3), 331–337.
- Palme, R., & Mostl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International J Mammalian Biol*, 62, 192–197.
- Palme, R., Robia, C., Baumgartner, W., & Möstl, E. (2000). Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentrations. *Vet Record*, 146(4), 107–109.
- Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M., & Lepschy, M. (2013). Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 100(9–10), 238–246.
- Palmer, C. (2005). Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64(3), 469–479.
- Palmer, C., Amundson, S., Brito, L., Waldner, C., & Barth, A. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Anim Reprod Sci*,



80(3–4), 213–223.

Palmer, C., Brito, L., Arteaga, A., Söderquist, L., Persson, Y., & Barth, A. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Anim Reprod Sci*, 87(1–2), 25–31.

Pargas, H., Mendoza, M., Márquez, Y., Bastidas, Z., Rivero, J., Colmenárez, D., & Puzzar, S. (2014). Valoración del estrés en toros brasileños y venezolanos mediante la evaluación de las concentraciones de cortisol y el recuento leucocitario. *Rev Fac Cs Vets UCV*, 55(2), 88–95.

Peña, A. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, 82–83, 209–224.

Peñaranda, J., & Vallejo, D. (2012). Efecto de la progesterona aplicada siete días post-inseminación en la preñez de vacas Holstein en la Hacienda El Cortijo del cantón Biblián.

Pérez, R. (2010). Agonistas alfa 2. In *Farmacología Veterinaria* (Vol. 53, pp. 126–128).

Próspero, V., & César, A. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev Inv Vet Perú*, 23(2), 192–200.

Quintanilla, G., Gómez, S., Rodríguez, B., Cano, M., García, M., & Pardo, M. (2011). Protocolo extracción sanguínea a través de los distintos tipos de catéteres. (pp. 1–16).

Ramónez, J. (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino.

Rego, J., Moura, A., Nouwens, A., McGowan, M., & Boe-Hansen, G. (2015). Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Anim Reprod*



Sci, 160, 126–137.

Robson, C., Aguilar, D., López, S., Calvi, M., Cerlser, R., Flores, F., & Gómez, M. (2004). Inseminación artificial en bovinos (pp. 1–30).

Rodríguez, V. (1995). "Reproducción en equinos". En: Fisiología Veterinaria por García Sacristán A, Castijón Mf De la Cruz Palomino LF. Editorial Interamericana. Madrid. España (pp.1929-1969.)

Romero, A. (2009). Determinación de estrés a partir de muestras fecales en el pudú (pudú puda): evaluación del efecto de la extracción de semen en los animales del centro de rehabilitación de fauna silvestre (cerfas), Universidad Austral de Chile.

Romero, M., Uribe, L., & Sánchez, J. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud, 10(1), 71–87.

Rosés, G. (2013). Colección de semen en diferentes especies (pp. 1–76).

Sánchez, A., Rubilar, J., & Gatica, R. (2002). Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. Arch Med Vet, 34(1), 123–130.

Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano- Díaz, A., Esteso, M., López-Sebastián, A., Guerra, R., ... Hildebrandt, T. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. Theriogenology, 79(2), 383–391.

Shalm, O. W. (1964). Hematología Veterinaria. México D.F.

Stead, S., Meltzer, D., & Palme, R. (2000). The measurement of glucocorticoid concentrations in the serum and faeces of captive African elephants ( *Loxodonta africana* ) after ACTH stimulation. J S Afr Vet Assoc, 71(3), 192–196.

Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). Tranquilizantes. In Farmacología



Veterinaria (pp. 721–724).

- Sylla, L., Palombi, C., Stradaoli, G., Vagniluca, A., & Monaci, M. (2015). Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. *Theriogenology*, 83(5), 779–785. En línea <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.011>
- Tejerina, F. (2007). Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco.
- Toosi, B., Gratton, G., McCorkell, R., Wynne-Edwards, K., Woodbury, M., & Lessard, C. (2013). Effects of pipothiazine palmitate on handling stress and on the characteristics of semen collected by electroejaculation in bison (*Bison bison*) bulls. *Anim Reprod Sci*, 138(1–2), 55–63.
- Touma, C., & Palme, R. (2005). Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in mammals and birds :the importance of validation. *Ann N Y Acad Sci*, 74(0), 54–74.
- Trujillo, G., (2008). Anatomía y Fisiología del Tracto Reproductivo. En línea <http://cegbucc.foroes.org/t22-anatomia-y-fisiologia-del-tracto-reproductivo-parte-1>.
- Ungerfeld, R., López-Sebastián, A., Estes, M., Pradiee, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Labrador, B., Santiago-Moreno, J. (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 84(7), 1067–1074.
- Universidad Nacional Abierta y a Distancia de Colombia. (2013). Módulo de reproducción animal básica.
- Villanery. (2014). Guía para la correcta toma de sangre en bovinos (pp. 1–4).



Welsh, T., & Johnson, B. (2015). Stress-Induced Alterations in Secretion of Corticosteroids, Progesterone, Luteinizing Hormone, and Testosterone in Bulls. *Endocrinology*, 109(1), 185–190.

Whitlock, B., Coffman, E., Coetzee, J., & Daniel, J. (2012). Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone , but not substance P , in beef bulls. *Theriogenology*, 78(4), 737–746.

Zemjanis, R. (1970). *Diagnostic and Therapeutic Techniques in Animal Reproduction*. 2nd Ed.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Prueba de U de Mann Withney para variable No Paramétrica Color

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>	
	Color
U de Mann-Whitney	67,000
W de Wilcoxon	238,000
Z	-,761
Sig. asintótica (bilateral)	<b>0,447 (NS)</b>
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	0,495 <sup>b</sup>
a. Variable de agrupación: Tratamiento	
b. No corregido para empates.	

### Anexo 2. Prueba de Shapiro Wilk, para normalidad de datos de calidad seminal en fresco por tratamiento

Pruebas de normalidad				
Parámetro de calidad seminal	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Volumen	Sin Tranquilizante	0,944	18	0,344
	Con Tranquilizante	0,868	9	0,117
Concentración	Sin Tranquilizante	0,936	18	0,244
	Con Tranquilizante	0,886	9	0,181
MM	Sin Tranquilizante	0,878	18	<b>0,024</b>
	Con Tranquilizante	0,845	9	0,065
MIP	Sin Tranquilizante	0,773	18	<b>0,001</b>
	Con Tranquilizante	0,873	9	0,131
VE	Sin Tranquilizante	0,937	18	0,253
	Con Tranquilizante	0,975	9	0,937
Anormalidades	Sin Tranquilizante	0,956	18	0,528
	Con Tranquilizante	0,849	9	0,073
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.				
a. Corrección de significación de Lilliefors				

**Anexo 3.** Prueba de Levene, para igualdad de las varianzas en variables de calidad seminal en fresco por tratamiento

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	α Estadístico de Levene	agl1	gl2	Sig.
<b>Volumen</b>	2,444	1	25	0,131
<b>Concentración</b>	,263	1	25	0,613
<b>MM</b>	,913	1	25	0,349
<b>MIP</b>	2,151	1	25	0,155
<b>VE</b>	,599	1	25	0,446
<b>Anormalidades</b>	,277	1	25	0,603

**Anexo 4.** Prueba de Inter-sujetos (ANOVA) de las variables de calidad espermática en semen fresco por tratamiento y toro.

ANOVA - Pruebas de efectos inter-sujetos							
Variable dependiente	Factor	Estadístico	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen	Intersección	Hipótesis	309,123	1	309,123	34,654	0,027
		Error	18,126	2,032	8,920 <sup>a</sup>		
	Tratamiento	Hipótesis	1,434	1	1,434	2,258	0,147
		Error	14,610	23	,635 <sup>b</sup>		
	Toro	Hipótesis	19,912	2	9,956	15,673	<b>0,000*</b>
		Error	14,610	23	,635 <sup>b</sup>		
Concentración	Intersección	Hipótesis	14707872,667	1	14707872,667	18,450	0,048
		Error	1642242,485	2,060	797168,435 <sup>a</sup>		
	Tratamiento	Hipótesis	107557,407	1	107557,407	1,020	0,323
		Error	2426184,593	23	105486,287 <sup>b</sup>		
	Toro	Hipótesis	1767257,407	2	883628,704	8,377	<b>0,002*</b>
		Error	2426184,593	23	105486,287 <sup>b</sup>		
Vitalidad	Intersección	Hipótesis	154775,574	1	154775,574	2234,846	0,000
		Error	205,597	2,969	69,256 <sup>a</sup>		
	Tratamiento	Hipótesis	25,352	1	25,352	,225	0,640
		Error	2593,981	23	112,782 <sup>b</sup>		
	Toro	Hipótesis	127,630	2	63,815	,566	0,576
		Error	2593,981	23	112,782 <sup>b</sup>		
Anormalidades	Intersección	Hipótesis	13097,796	1	13097,796	204,661	0,001
		Error	187,490	2,930	63,997 <sup>a</sup>		
	Tratamiento	Hipótesis	17,796	1	17,796	,176	0,679
		Error	2323,315	23	101,014 <sup>b</sup>		
	Toro	Hipótesis	118,741	2	59,370	,588	0,564
		Error	2323,315	23	101,014 <sup>b</sup>		
a. ,889 MS(Toro) + ,111 MS(Error)							
b. MS(Error)							



**Anexo 5.** Prueba U de Mann Withney de las variables de calidad espermática en semen fresco por tratamiento sin Normalidad de datos

TRATAMIENTO - Estadísticos de prueba <sup>a</sup>		
	MM	MIP
<b>U de Mann-Whitney</b>	71,500	57,000
<b>W de Wilcoxon</b>	116,500	102,000
<b>Z</b>	-,505	-1,321
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	0,613	0,186
<b>Significación exacta [2*(sig. unilateral)]</b>	0,631 <sup>b</sup>	0,232 <sup>b</sup>
<b>a. Variable de agrupación: Tratamiento</b>		
<b>b. No corregido para empates.</b>		

**Anexo 6.** Prueba de Shapiro Wilk, para normalidad de datos de calidad seminal posdescongelación por tratamiento

Pruebas de normalidad				
Trat_Post_des		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
<b>MIP</b>	Sin Tranquilizante	0,866	33	<b>0,001</b>
	Con Tranquilizante	0,887	14	0,074
<b>VE</b>	Sin Tranquilizante	0,862	33	<b>0,001</b>
	Con Tranquilizante	0,934	14	0,347
<b>AC</b>	Sin Tranquilizante	0,937	33	0,057
	Con Tranquilizante	0,866	14	<b>0,036</b>
<b>AT</b>	Sin Tranquilizante	0,938	33	0,058
	Con Tranquilizante	0,935	14	0,362
<b>HOS</b>	Sin Tranquilizante	0,949	33	0,127
	Con Tranquilizante	0,843	14	<b>0,018</b>
<b>*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.</b>				
<b>a. Corrección de significación de Lilliefors</b>				

**Anexo 7.** Prueba de Levene, para igualdad de las varianzas en variables de calidad seminal posdescongelación por tratamiento

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>MIP_des</b>	0,619	1	45	0,435
<b>VE_des</b>	0,001	1	45	0,982
<b>AC_des</b>	3,877	1	45	0,055
<b>AT_des</b>	5,754	1	45	<b>0,021</b>
<b>HOS</b>	0,032	1	45	0,859

**Anexo 8.** Prueba de Inter-sujetos (ANOVA) de las variables de calidad espermática posdescongelación por tratamiento y toro.

ANOVA - Pruebas de efectos inter-sujetos							
Variable	Origen		Tipo III de suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
MIP	Intersección	Hipótesis	145535,771	1	145535,771	351,566	,000
		Error	1167,097	2,819	413,964 <sup>a</sup>		
	Trat_Post_des	Hipótesis	3,003	1	3,003	,008	,931
		Error	16781,545	43	390,268 <sup>b</sup>		
	Toro_Post	Hipótesis	837,502	2	418,751	1,073	,351
		Error	16781,545	43	390,268 <sup>b</sup>		
VE	Intersección	Hipótesis	197036,975	1	197036,975	1400,392	,000
		Error	337,113	2,396	140,701 <sup>a</sup>		
	Trat_Post_des	Hipótesis	8,746	1	8,746	,121	,730
		Error	3115,756	43	72,459 <sup>b</sup>		
	Toro_Post	Hipótesis	308,974	2	154,487	2,132	,131
		Error	3115,756	43	72,459 <sup>b</sup>		
AC	Intersección	Hipótesis	21007,108	1	21007,108	238,590	,001
		Error	234,622	2,665	88,047 <sup>a</sup>		
	Trat_Post_des	Hipótesis	16,858	1	16,858	,240	,627
		Error	3022,003	43	70,279 <sup>b</sup>		
	Toro_Post	Hipótesis	183,272	2	91,636	1,304	,282
		Error	3022,003	43	70,279 <sup>b</sup>		
AT	Intersección	Hipótesis	24825,034	1	24825,034	290,242	,001
		Error	227,918	2,665	85,532 <sup>a</sup>		
	Trat_Post_des	Hipótesis	12,085	1	12,085	,177	,676
		Error	2935,545	43	68,268 <sup>b</sup>		
	Toro_Post	Hipótesis	178,039	2	89,020	1,304	,282
		Error	2935,545	43	68,268 <sup>b</sup>		
HOS	Intersección	Hipótesis	24095,521	1	24095,521	60,055	,015
		Error	834,017	2,079	401,225 <sup>a</sup>		
	Trat_Post_des	Hipótesis	35,082	1	35,082	,769	,385
		Error	1962,427	43	45,638 <sup>b</sup>		
	Toro_Post	Hipótesis	946,112	2	473,056	10,365	<b>0,000*</b>
		Error	1962,427	43	45,638 <sup>b</sup>		
<b>a. ,832 MS(Toro_Post) + ,168 MS(Error)</b>							
<b>b. MS(Error)</b>							

**Anexo 9.** Prueba U de Mann Withney de las variables de calidad espermática posdescongelación por tratamiento sin Normalidad de datos

TRATAMIENTO - Estadísticos de prueba <sup>a</sup>				
	MIP_des	VE_des	AC_des	HOS
<b>U de Mann-Whitney</b>	85,500	95,500	97,500	58,000
<b>W de Wilcoxon</b>	176,500	186,500	233,500	149,000
<b>Z</b>	-,824	-,374	-,286	-2,024
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	0,410	0,709	0,775	<b>0,043*</b>
<b>Significación exacta [2*(sig. unilateral)]</b>	0,423 <sup>b</sup>	0,714 <sup>b</sup>	0,779 <sup>b</sup>	0,045 <sup>b</sup>
<b>a. Variable de agrupación: Toro_Post</b>				
<b>b. No corregido para empates.</b>				

**Anexo 10.** Prueba de Shapiro Wilk para normalidad de datos de los valores de Cortisol y Progesterona sérica por tratamientos

Parámetro	Tiempo de evaluación del cortisol	Tratamientos	Shapiro-Wilk		
			Estadístico	gl	Sig.
<b>Cortisol</b>	20 minutos antes	T1	0,941	6	0,669
		T2	0,859	3	0,265
	5 minutos antes	T1	0,824	6	0,095
		T2	0,777	3	0,060
	0 minutos	T1	0,890	6	0,316
		T2	0,997	3	0,902
	5 minutos después	T1	0,815	6	0,079
		T2	0,868	3	0,289
	20 minutos después	T1	0,643	6	<b>0,001</b>
		T2	0,823	3	0,171
<b>P4</b>	20 minutos antes	T1	0,934	6	0,608
		T2	0,959	3	0,611
	5 minutos antes	T1	0,887	6	0,305
		T2	0,996	3	0,874
	0 minutos	T1	0,953	6	0,768
		T2	0,873	3	0,303
	5 minutos después	T1	0,741	6	<b>0,016</b>
		T2	0,969	3	0,664
	20 minutos después	T1	0,904	6	0,400
		T2	0,992	3	0,831

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Anexo 11.** Prueba de Levene para homogeneidad de las varianzas de los valores de Cortisol y progesterona sérica.

Parámetro	Tiempo de evaluación	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>Cortisol</b>	20 minutos antes	5,732	1	<b>7</b>	<b>0,048</b>
	5 minutos antes	1,685	1	7	0,235
	0 minutos	6,440	1	7	0,039
	5 minutos después	1,559	1	7	0,252
	20 minutos después	0,165	1	7	0,697
<b>Progesterona</b>	20 minutos antes	1,687	1	7	0,235
	5 minutos antes	0,847	1	7	0,388
	0 minutos	3,880	1	7	0,090
	5 minutos después	6,231	1	7	<b>0,041</b>
	20 minutos después	8,216	1	7	<b>0,024</b>

**Anexo 12.** ANOVA para las concentraciones de Cortisol sanguíneo en los diferentes tiempos con respecto a la sesión de electroeyaculación.

Cortisol en sangre		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
20 minutos antes	Entre grupos	,036	1	,036	0,029	0,870
	Dentro de grupos	8,807	7	1,258		
	Total	8,843	8			
5 minutos antes	Entre grupos	11,568	1	11,568	33,914	<b>0,001</b>
	Dentro de grupos	2,388	7	,341		
	Total	13,956	8			
0 minutos	Entre grupos	4,451	1	4,451	4,345	0,076
	Dentro de grupos	7,170	7	1,024		
	Total	11,621	8			
5 minutos después	Entre grupos	6,764	1	6,764	5,595	0,050
	Dentro de grupos	8,462	7	1,209		
	Total	15,226	8			
20 minutos después	Entre grupos	,020	1	,020	,017	0,901
	Dentro de grupos	8,303	7	1,186		
	Total	8,323	8			

**Anexo 13.** Prueba U de Mann Withney de los niveles del cortisol sanguíneos para los 20 minutos posteriores a la colecta sin Normalidad de datos.

TRATAMIENTO- Estadísticos de prueba	
	20 minutos después
U de Mann-Whitney	7,000
W de Wilcoxon	28,000
Z	-,519
Sig. Asintót. (bilateral)	,604
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,714 <sup>a</sup>
a. No corregidos para los empates.	
b. Variable de agrupación: tratamiento	

**Anexo 14.** ANOVA para P4 sanguíneo en los distintos tiempos en relación a la electroeyaculación.

P4 en sangre		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
20 minutos antes	Entre grupos	,028	1	,028	2,512	0,157
	Dentro de grupos	,078	7	,011		
	Total	,106	8			
5 minutos antes	Entre grupos	,004	1	,004	,175	0,689
	Dentro de grupos	,171	7	,024		
	Total	,175	8			
0 minutos	Entre grupos	,007	1	,007	,903	0,374
	Dentro de grupos	,058	7	,008		
	Total	,065	8			
5 minutos después	Entre grupos	,061	1	,061	2,040	0,196
	Dentro de grupos	,208	7	,030		
	Total	,269	8			
20 minutos después	Entre grupos	,032	1	,032	2,720	0,143
	Dentro de grupos	,083	7	,012		
	Total	,115	8			

**Anexo 15.** Prueba U de Mann Withney de los niveles del P4 sanguíneos para los 5 minutos posteriores a la colecta sin Normalidad de datos.

TRATAMIENTO- Estadísticos de prueba		
5 minutos después		
U	de	Mann-Whitney
1,000		
W de Wilcoxon		7,000
Z		-2,074
Sig. Asintót. (bilateral)		,038
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]		,048 <sup>a</sup>

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: tratamiento

**Anexo 16.** ANOVA para el análisis de metabolitos de Cortisol en heces obtenidas antes y después (8 horas) de la electroeyaculación.

Metabolitos de Cortisol en heces		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Antes de la colecta de semen	Entre grupos	98,000	1	98,000	0,083	0,775
	Dentro de grupos	29396,975	25	1175,879		
	Total	29494,975	26			
Después de la colecta (8 horas)	Entre grupos	11070,162	1	11070,162	9,232	0,006
	Dentro de grupos	29978,524	25	1199,141		
	Total	41048,686	26			

**Anexo 17.** ANOVA para P4 de muestras fecales obtenidas antes y después (8 horas) de la electroeyaculación.

P4 en heces		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Antes de la colecta de semen	Entre grupos	100,167	1	100,167	0,019	0,893
	Dentro de grupos	134402,304	25	5376,092		
	Total	134502,471	26			
Después de la colecta (8 horas)	Entre grupos	38674,408	1	38674,408	5,606	0,026
	Dentro de grupos	172472,559	25	6898,902		
	Total	211146,967	26			



**Anexo 18. Cronograma de actividades.**

<b>LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍAS DE IRQUIS</b>			
<b>ACTIVIDADES ELECTROEYACULACIÓN + MTR + CORTISOL</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Muestras de Heces</b>	<b>Muestras de Sangre</b>	<b>Observaciones</b>
Jueves	SI	SI	Canalizar Toros en la mañana 7 am, Colecta y evaluación de semen 10 am.
Lunes	SI	NO	Colecta y evaluación seminal
Jueves	SI	SI	Canalizar Toros en la mañana 7 am, Colecta y evaluación de semen 10 am.
Lunes	SI	NO	Colecta y evaluación seminal
Jueves	SI	SI	Canalizar Toros en la mañana 7 am, Colecta y evaluación de semen 10 am.
Lunes	SI	NO	Colecta y evaluación seminal
Jueves	SI	SI	Canalizar Toros en la mañana 7 am, Colecta y evaluación de semen 10 am.
Lunes	SI	NO	Colecta y evaluación seminal
Jueves	SI	SI	Canalizar Toros en la mañana 7 am, Colecta y evaluación de semen 10 am.
Un mes	-----	-----	Evaluación de muestras seminales pos congelación en laboratorio (Irquis)
Dos meses	-----	-----	Análisis laboratorial de muestras sanguíneas y/o heces
Dos meses	-----	-----	Redacción de trabajo de tesis y presentación





**Anexo 19. Distribución de los tratamientos aleatoriamente.**

Toros #								Tratamientos									
1 Santa Ana		2 Oña		3 Negro		T1: Sin Tranquilizante						T2: Con Tranquilizante					
Semana 1				Semana 2				Semana 3				Semana 4				Semana 5	
Sesión 1		Sesión 2		Sesión 1		Sesión 2		Sesión 1		Sesión 2		Sesión 1		Sesión 2		Sesión 1	
Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat	Trat
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1; 2	3	1; 3	2	2; 3	1	1; 2	3	1; 3	2	2; 3	1	1; 2	3	1; 3	2	2 ; 3	1



**Anexo 20. Hoja de campo para evaluación de la colecta de semen bovino en la granja de Irquis**

EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULACIÓN DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE.”												
Fecha de Colecta	Nombre del toro	volumen eyaculado (ml)	Color	Concentración	Motilidad Masal	Motilidad individual	% vivos	% Anormales	Congelación	Tratamientos		Observación
										ST	CT	



Anexo 21. Hoja de evaluación seminal poscongelación.

“EVALUACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE SEMEN COLECTADO CON ELECTROEYACULACIÓN DE TOROS TRATADOS CON Y SIN TRANQUILIZANTE”									
Fecha de evaluación	Toro	Diluyente	Fecha de procesamiento	Método de colecta	MIP	Vitalidad Espermática %	Anormalidades		HOST %
							Colas %	Total %	

**Anexo 22. Extracción sanguínea con la utilización de una extensión de venocclisis**



**Anexo 23. Preparación previa a la sesión de electroeyaculación**



**Anexo 24. Obtención de semen**



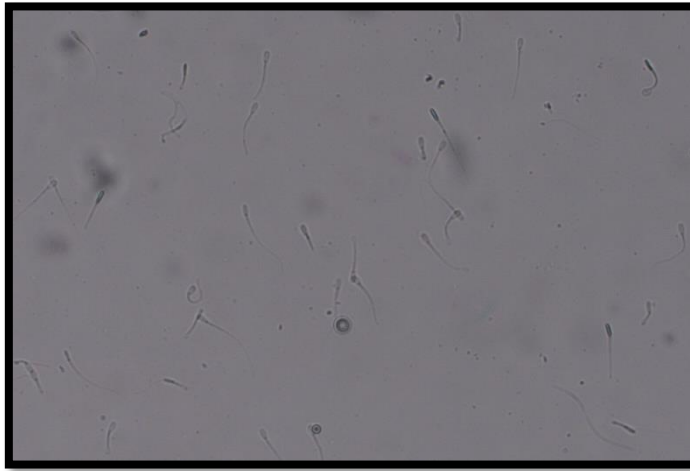
### Anexo 25. Evaluación de la morfología y vitalidad espermática



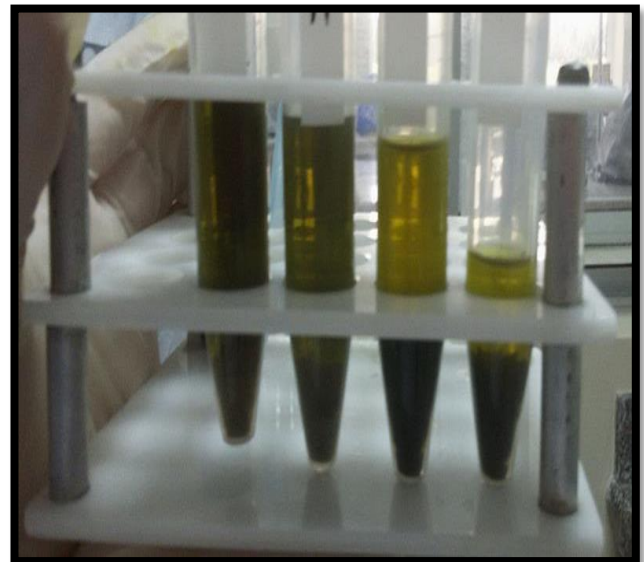
### Anexo 26. Empajuelamiento y criopreservación del semen



### Anexo 27. Evaluación posdescongelación-Test de HOS



### Anexo 28. Procedimiento para la obtención de metabolitos de Cortisol y Progesterona de muestras fecales





## Anexo 29. Materiales



# Anexo 30. Operacionalización de las variables

DEFINICIÓN:	VARIABLES	TIPO	MEDICIÓN
	<b>INDEPENDIENTE</b>		
Sin tranquilizante T1			
Con tranquilizante T2	Tratamientos	Nominal	Respuesta -animal
	<b>DEPENDIENTES</b>		
	<b>CARACT. MACROSCÓPICAS-SEMEN</b>		
Cantidad de semen colectado	Volumen	Escala	MI
Color del semen colectado	Color	Ordinal	Blanco amarillento Blanco lechoso Blanco azulado Gris
	<b>CARACT. MICROSCÓPICAS-SEMEN</b>		
Número de espermatozoides /ml	Concentración	Escala	x10 <sup>6</sup> /ml
Ondas producidas por el movimiento de espermatozoides en masa	Motilidad Masal	Ordinal	0= inmóvil 1= escaso 2=regular 3= bueno 4= muy bueno
Movimiento lineal individual de los espermatozoides	Motilidad Individual	Ordinal	Excelente = >70% Bueno= 50-70% Regular= 30-50 % Malo= <30 %
Normales Anormales (sin cabeza, cabeza pequeña, cola suelta, cola quebrada, etc)	Morfología	Ordinal	%
Se contarán los espermatozoides vivos y muertos ( los que absorben el colorante)	Vivos y Muertos	Ordinal	%
Valora la integridad de la membrana plasmática (capacidad para intercambiar líquidos)	Test hiposmótico	Ordinal	%
	<b>PRUEBAS SANGUÍNEAS</b>		
Indicativo de estrés	Cortisol	Escala	ng/ml
Indicativo de estrés	Progesterona	Escala	ng/ml